

Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



Veröffentlichungsnummer: 0 417 563 A3

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

Anmeldenummer: 90116707.2

Int. Cl.⁸: C07K 15/12, C12N 15/12,
C12N 1/21, C07K 3/28,
A61K 39/395

Anmeldetag: 31.08.90

Priorität: 12.09.89 CH 3319/89
08.03.90 CH 746/90
20.04.90 CH 1347/90

Veröffentlichungstag der Anmeldung:
20.03.91 Patentblatt 91/12

Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK FR GB IT LI NL

Veröffentlichungstag des später veröffentlichten
Recherchenberichts: 29.04.92 Patentblatt 92/18

Anmelder: F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
Postfach 3256
CH-4002 Basel(CH)

Erfinder: Brockhaus, Manfred, Dr.
Taltweg 29
CH-4126 Bettingen(CH)

Erfinder: Dombic, Zlatko, Dr.
Gempenstrasse 39
CH-4053 Basel(CH)

Erfinder: Gentz, Rainer, Dr.
Finkenweg 13
W-7899 Rheinfelden(DE)

Erfinder: Lesslauer, Werner, Dr.
Maignanostrasse 16
D-4059 Basel(CH)

Erfinder: Löttscher, Hansruedi, Dr.
Frankenstrasse 18
CH-4313 Mühlin(CH)

Erfinder: Schlaeger, Ernst-Jürgen, Dr.
Neue Strasse 63
W-7859 Efringen-Kirchen(DE)

Vertreter: Mezger, Wolfgang, Dr. et al
Grenzacherstrasse 124 Postfach 3256
CH-4002 Basel(CH)

TNF-bindende Proteine.

Die vorliegende Erfindung betrifft nichtlösliche Proteine sowie lösliche oder nichtlösliche Fragmente davon, die TNF binden, in homogener Form, sowie deren physiologisch verträglichen Salze, insbesondere solche Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 55 oder 75 kD (nichtreduzierende SDS-PAGE-Bedingungen), Verfahren zur Isolierung solcher Proteine, Antikörper gegen solche Proteine, DNA-Sequenzen, die für nichtlösliche Proteine sowie lösliche oder nichtlösliche Fragmente davon, die TNF binden, kodieren, wie solche, die für Proteine kodieren, die zum einen Teil aus einem löslichen Frag-

ment das TNF bindet und zum anderen Teil aus allen Domänen ausser der ersten der konstanten Region der schweren Kette humaner Immunglobuline bestehen und die davon kodierten rekombinanten Proteine wie Verfahren zur deren Herstellung mittels transformierter pro- wie eukaryotischer Wirtszellen.

Best Available Copy

EP 0 417 563 A3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT

Nach der Anordnung

der nach Regel 45 des Europäischen Patent-
übereinkommens für das weitere Verfahren als
europäischer Recherchenbericht gilt

EP 90 11 6707

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 8)
X	BIOLOGICAL ABSTRACTS, Band 88, Nr. 12, 1988, Zusammenfassung Nr. 130862; D. NOVICK et al.: "Soluble cytokine receptors are present in normal human urine" & J. EXP. MED. 170(4), 1409-1414 * Zusammenfassung *	1	C 07 K 15/12 C 12 N 15/12 C 12 N 1/21 C 07 K 3/28 A 61 K 39/395
X, D	EP-A-0 308 378 (YEDA) * Das ganze Dokument *	1, 15-16	
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Band 264, Nr. 20, 15. Juli 1989, Seiten 11966-11973, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.; P. SECKINGER et al.: "Purification and biologic characterization of a specific tumor necrosis factor alpha inhibitor" * Der ganze Artikel *	1	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 8)
			C 07 K C 12 N A 61 K
UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE			
<p>Nach Auffassung der Recherchanstalt entspricht die vorliegende europäische Patentsuchanfrage den Vorschriften des Europäischen Patentübereinkommens so wenig, daß es nicht möglich ist, auf der Grundlage einiger Patentansprüche eine volle Ermittlung über den Stand der Technik durchzuführen.</p> <p>Vollständig recherchierte Patentansprüche: Unvollständig recherchierte Patentansprüche: 17-18 Nicht recherchierte Patentansprüche: Grund für die Beendigung der Recherche:</p> <p>Verfahren zur chirurgischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers (siehe Art. 52(4) des Europäischen Patentübereinkommens).</p>			
Ort und Datum		Datum der Recherche	
DEN HAAG		27-01-1992	
		Prüfer	
		MASTURZO P.	
KATEGORIE DER GENANTEN DOKUMENTEN			
I : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentschriftstück, das jedoch erst nach oder nach der Anmeldung veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technischer Hintergrund O : nichttechnischer Hintergrund P : Zwischenliteratur			

0000 0000 0000 0000 0000 0000



Europäisches
Patentamt

EP 90 11 6707

GEBÜHRENPFLICHTIGE PATENTANSPRÜCHE

Die vorliegende europäische Patentanmeldung enthält bei ihrer Einreichung mehr als zehn Patentansprüche.

- ☐ Alle Anspruchgebühren wurden innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.
- ☐ Nur ein Teil der Anspruchgebühren wurde innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die ersten zehn sowie für jene Patentansprüche erstellt für die Anspruchgebühren entrichtet wurden.
nämlich Patentansprüche:
- ☐ Keine der Anspruchgebühren wurde innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die ersten zehn Patentansprüche erstellt.

MANGELNDE EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG

Nach Auffassung der Rechercheneinstellung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung nicht den Anforderungen an die Einheitlichkeit der Erfindung; sie enthält mehrere Erfindungen oder Gruppen von Erfindungen, nämlich:

siehe Blatt -B-

- ☒ Alle weiteren Recherchengebühren wurden innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.
- ☐ Nur ein Teil der weiteren Recherchengebühren wurde innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf Erfindungen beziehen, für die Recherchengebühren entrichtet worden sind.
nämlich Patentansprüche:
- ☐ Keine der weiteren Recherchengebühren wurde innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf die zuerst in den Patentansprüchen erwähnte Erfindung beziehen.
nämlich Patentansprüche:



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 90 11 6707

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. CL.9)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Beurteilt Anspruch	
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Band 264, Nr. 20, 15. Juli 1989, Seiten 11974-11980, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.; H. ENGELMANN et al.: "A tumor necrosis factor-binding protein purifies to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity" * Der ganze Artikel *	1	
P,X	EP-A-0 393 438 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GmbH) * Das ganze Dokument *	1-4,9- 11,13- 16,19	
T	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES; Band 87, Nr. 19, Oktober 1990, Seiten 7380-7384; P.W. GRAY et al.: "Cloning of human tumor necrosis factor (TNF) receptor cDNA and expression of recombinant soluble TNF-binding protein" * Der ganze Artikel *	1-4,9- 11,13- 14,19	RECHERCHIETE SACHGEBIETE (Int. CL.9)
P,X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Band 265, Nr. 3, 25. Januar 1990, Seiten 1531-1536, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.; H. ENGELMANN et al.: "Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine" * Der ganze Artikel *	1	
P,X	CELL, Band 61, Nr. 2, 20. April 1990, Seiten 351-359, Cell Press; H. LOETSCHER et al.: "Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor" * Der ganze Artikel *	1-4,9- 11,13- 14,19	
P,X	CELL, Band 61, Nr. 2, 20. April 1990, Seiten 361-370, Cell Press; T.J. SCHALL et al.: "Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor" * Der ganze Artikel *	1-4,9- 11,13- 14,19	
	---	---	

EP 90 11 6707 (PC/12)

-/-



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 90 11 6707

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 9)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	
P,X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, Band 87, Nr. 16, August 1990, Seiten 6151-6155; R.A. HELLER et al.: "Complementary DNA cloning of a receptor for tumor necrosis factor and demonstration of a shed form of the receptor" " Der ganze Artikel "	1-4,9- 11,13- 14,19	
P,X	SCIENCE, Band 248, 25. Mai 1990, Seiten 1019-1023; C.A. SMITH et al.: "A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins" " Der ganze Artikel "	1-4,9- 11,13- 14,19	
			DECKERCHIEDTE SACHGEMEINTE (Int. Cl. 9)
P,X	GB-A-2 218 101 (GLAXO) " Das ganze Dokument "	1-4,9- 11,13- 16,19	
P,X	EUR. JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Band 20, 1990, Seiten 1167-1174, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, DE; P. SECKINGER et al.: "Tumor necrosis factor inhibitor: purification, NH2-terminal amino acid sequence and evidence for antiinflammatory and immunomodulatory activities" " Der ganze Artikel "	1	
E	WO-A-9 013 575 (BASF) " Das ganze Dokument "	1	
E	EP-A-0 418 014 (IMMUNEX) " Das ganze Dokument "	1-4,9- 11,13- 16,19	
X	EP-A-0 230 574 (YALE UNIVERSITY) " Das ganze Dokument, insbesondere Beispiel 3, Seiten 6-7 "	12,15- 16	
X	US-A-4 770 995 (RUBIN et al.) " Das ganze Dokument, insbesondere Beispiel 2, Spalte 7 "	12	
	--- -/-		

EP 90 11 6707 (12-11)



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 90 11 6707

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. CL.9)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der veröffentlichten Teile	Betreff Anspruch	
X	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Band 264, Nr. 25, 5. September 1989, Seiten 14927-14934, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc., US; H.-P. HOHMANN et al.: "Two different cell types have different major receptors for human tumor necrosis factor (TNFalpha)" * Der ganze Artikel, insbesondere Seite 14930, rechte Spalte, Zeile 30 - Seite 14931, linke Spalte, Zeile 25 *	12	
P, X	EP-A-0 398 327 (YEDA) * Das ganze Dokument *	1-4, 8- 16, 19	
P, X	EP-A-0 334 165 (HOFFMANN-LA ROCHE) * Das ganze Dokument *	1-4, 8- 16, 19	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. CL.9)
T	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, Abstract, 20th Annual Meetings, 'Keystone Symposia on Molecular & Cellular Biology, supplement 15F, 1991, 1. - 7. April 1991, Seite 118, Zusammenfassung Nr. P 439, Wiley-Liss; K. PEPPEL et al.: "Chimaeric TNF-receptor - IgG molecule acts as soluble inhibitor of the mediated cytotoxicity" * Der ganze Artikel *	5-8	

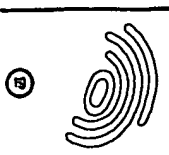


MANGELNDE EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG

Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung nicht den Anforderungen an die Einheitlichkeit der Erfindung; sie enthält mehrere Erfindungen oder Gruppen von Erfindungen, nämlich:

1. Patentansprüche 1-4 und 8-11,13-14,19(teilweise).
2. Patentansprüche 5-7 und 8-12,14-19(teilweise).
3. Patentanspruch 12(teilweise).
4. Patentanspruch 13(teilweise).
5. Patentansprüche 15-16(teilweise).

1. Nichtlösliche Proteine und lösliche oder nichtlösliche Fragmente davon, die TNF binden, DNA-Sequenzen, die für die obengenannten Proteine kodieren, Vektoren, die diese DNA-Sequenzen enthalten und Wirtssysteme mit diesen Vektoren transformiert und Verwendung davon zur Herstellung der Proteine.
2. Fusionsproteine, die ein Fragment des TNF-bindenden Proteins und eine Ig-stammende Domäne enthalten, DNA-Sequenzen, die für die obengenannten Proteine kodieren, Vektoren die diese DNA-Sequenzen für die obengenannten Fusionsproteine enthalten, Wirtssysteme mit diesen Vektoren transformiert gegen diese Fusionsproteine gerichtete Antikörper. Verfahren zur Herstellung dieser Fusionsproteine und pharmazeutische Zusammenfassungen sie enthaltend.
3. Gegen Produkte des Anspruchs 1 gerichtete Antikörper.
4. Verfahren zur Herstellung eines Produkts des Anspruchs 1, falls nicht erworben unter Verwendung der DNA-Sequenzen als in Anspruch 1 erwähnt.
5. Pharmazeutische Zusammensetzungen, die ein Produkt des Anspruchs 1 enthalten.



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



⑪ Veröffentlichungsnummer: 0 417 563 A2

②

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

① Anmeldenummer: 90116707.2

⑨ Int. Cl.⁴: C07K 15/12, C12N 15/12,
C12N 1/21, C07K 3/28,
A61K 39/395

② Anmeldetag: 31.08.90

⑩ Priorität: 12.09.89 CH 3319/89
08.03.90 CH 746/90
20.04.90 CH 1347/90

⑬ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
20.03.91 Patentblatt 91/12

⑭ Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK FR GB IT LI NL

⑦ Anmelder: F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
Postfach 3255
CH-4002 Basel(CH)

⑫ Erfinder: Brockhaus, Manfred, Dr.
Tahweg 29
CH-4126 Bettingen(CH)
Erfinder: Dembic, Zlatko, Dr.
Gempenstrasse 39
CH-4063 Basel(CH)
Erfinder: Gentz, Reiner, Dr.
Finkenweg 13
W-7888 Rheinfelden(DE)
Erfinder: Lesslauer, Werner, Dr.
Maignanostrasse 16
D-4059 Basel(CH)
Erfinder: Lötscher, Hansruedi, Dr.
Frankenstrasse 18
CH-4313 Möhlin(CH)
Erfinder: Schlaeger, Ernst-Jürgen, Dr.
Neue Strasse 63
W-7859 Efringen-Kirchen(DE)

⑮ Vertreter: Mezger, Wolfgang, Dr. et al
Grenzacherstrasse 124 Postfach 3255
CH-4002 Basel(CH)

② TNF-bindende Proteine.

⑨ Die vorliegende Erfindung betrifft nichtlösliche Proteine sowie lösliche oder nichtlösliche Fragmente davon, die TNF binden, in homogener Form, sowie deren physiologisch verträglichen Salze, insbesondere solche Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 55 oder 75 kD (nichtreduzierende SDS-PAGE-Bedingungen), Verfahren zur Isolierung solcher Proteine Antikörper gegen solche Proteine, DNA-Sequenzen, die für nichtlösliche Proteine sowie lösliche oder nichtlösliche Fragmente davon, die TNF binden, kodieren, wie solche, die für Proteine kodieren, die zum einen Teil aus einem löslichen Fragment das TNF bindet und zum anderen Teil aus allen Domänen ausser der ersten der konstanten Region der schweren Kette humaner Immunglobuline bestehen und die davon kodierten rekombinanten Proteine wie Verfahren zur deren Herstellung mittels transformierter pro- wie eukaryotischer Wirtszellen.

EP 0 417 563 A2

TNF-BINDENDE PROTEINE

Tumor Nekrosis Faktor α (TNF α , auch Cachectin), auf Grund seiner haemorrhagisch-nekrotisierenden Wirkung auf bestimmte Tumoren entdeckt, und Lymphotoxin (TNF β) sind zwei nahe verwandte Peptidfaktoren [3] aus der Klasse der Lymphokine/Cytokine, die im folgenden beide als TNF bezeichnet werden [siehe Uebersichtsarbeiten 2 und 3]. TNF verfügt über ein breites zelluläres Wirkungsspektrum. Beispielsweise besitzt TNF inhibierende oder cytotoxische Wirkung auf eine Reihe von Tumorzelllinien [2,3], stimuliert die Proliferation von Fibroblasten und die phagozytierende/cytotoxische Aktivität von myeloischen Zellen [4,5,6], induziert Adhäsionsmoleküle in Endothelzellen oder übt eine inhibierende Wirkung auf Endothel aus [7,8,9,10], inhibiert die Synthese von spezifischen Enzymen in Adipozyten [11] und induziert die Expression von Histokompatibilitätsantigenen [12]. Manche dieser TNF-Wirkungen werden über eine Induktion von anderen Faktoren oder durch synergistische Effekte mit anderen Faktoren, wie beispielsweise Interferonen oder Interleukinen erzielt [13-16].

TNF ist bei einer Reihe von Pathologischen Zuständen, beispielsweise Schockzuständen bei Meningococcen-Sepsis [17], bei der Entwicklung von Autoimmun-Glomerulonephritis bei Mäusen [18] oder bei cerebraler Malaria bei Mäusen [19] und beim Menschen [41] involviert. Ganz allgemein scheinen die toxischen Wirkungen von Endotoxin durch TNF vermittelt zu sein [20]. Weiterhin kann TNF wie Interleukin-1 Fieber auslösen [39]. Auf Grund der pleiotropen funktionellen Eigenschaften von TNF kann man annehmen, dass TNF in Wechselwirkung mit anderen Cytokinen bei einer ganzen Reihe weiterer pathologischer Zustände als Mediator von Immunantwort, Entzündung oder anderen Prozessen beteiligt ist.

Diese biologischen Effekte werden durch TNF über spezifische Rezeptoren vermittelt, wobei nach heutigem Wissensstand sowohl TNF α wie TNF β an die gleichen Rezeptoren binden [21]. Verschiedene Zelltypen unterscheiden sich in der Anzahl von TNF-Rezeptoren [22,23,24]. Solche ganz allgemein gesprochen TNF-bindenden Proteine (TNF-BP) wurden durch kovalente Bindung an radioaktiv markiertes TNF nachgewiesen [24-29], wobei die folgenden scheinbaren Molekulargewichte der erhaltenen TNF/TNF-BP-Komplexe ermittelt wurden: 95/100 kD und 75 kD [24], 95 kD und 75 kD [25], 138 kD, 90 kD, 75 kD und 54 kD [26], 100 \pm 5 kD [27], 97 kD und 70 kD [28] und 145 kD [29]. Mittels anti-TNF-Antikörper-Immunoaffinitätschromatographie und präparativer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) konnte ein solcher TNF/TNF-BP-Komplex isoliert werden [27]. Die reduktive Spaltung dieses Komplexes und anschließende SDS-PAGE-Analyse ergab mehrere Banden, die allerdings nicht auf TNF-Bindeaktivität getestet wurden. Da die spezifischen Bedingungen, die zu der Spaltung des Komplexes verwendet werden müssen, zur Inaktivierung des Bindeproteins führen [31], ist letzteres auch nicht möglich gewesen. Die Anreicherung von löslichen TNF-BP aus dem humanen Serum oder Urin mittels Ionenaustauscher-Chromatographie und Gelfiltration (Molekulargewichte im Bereich von 50 kD) wurde von Olsson et al. beschrieben [30].

Brockhaus et al. [32] erhielten durch TNF α -Ligandenaffinitätschromatographie und HPLC aus Membranextrakten von HL60-Zellen eine angereicherte TNF-BP-Präparation, die wiederum als Antigenpräparation zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen TNF-BP verwendet wurde. Unter Verwendung eines solchen immobilisierten Antikörpers (Immunoaffinitätschromatographie) wurde mittels TNF α -Ligandenaffinitätschromatographie und HPLC von Loetscher und Brockhaus [31] aus einem Extrakt von humaner Placenta eine angereicherte Präparation von TNF-BP erhalten, die in der SDS-PAGE-Analyse eine starke breite Bande bei 35 kD, eine schwache Bande bei etwa 40 kD und eine sehr schwache Bande im Bereich zwischen 55 kD und 60 kD ergab. Im übrigen zeigte das Gel im Bereich von 33 kD bis 40 kD einen Proteinhintergrundschmier. Die Bedeutung der so erhaltenen Proteinbanden war jedoch im Hinblick auf die Heterogenität des verwendeten Ausgangsmaterials (Placenta-Gewebe; vereinigt Material aus mehreren Placenten) nicht klar.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind nichtlösliche Proteinen d.h. beispielsweise Membranproteine bzw. sogenannte Rezeptoren, und lösliche oder nichtlösliche Fragmente davon, die TNF binden (TNF-BP), in homogener Form, sowie deren Physiologisch verträgliche Salze. Bevorzugt sind solche Proteine, die gemäss SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen durch scheinbare Molekulargewichte von etwa 55 kD, 51 kD, 38 kD, 36 kD und 34 kD bzw. 75 kD und 65 kD charakterisiert sind, insbesondere solche mit etwa 55 kD und 75 kD. Weiterhin bevorzugt sind solche Proteine, die durch wenigstens eine der folgenden Aminosäureteilsequenzen gekennzeichnet sind:

(IA) Leu-Val-Pro-His-Leu-Gly-Asp-Arg-Glu-Lys-Arg-Asp-Ser-Val-Cys-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-X-Asn-Ser-Ile

(IB) Ser-Thr-Pro-Glu-Lys-Glu-Gly-Glu-Leu-Glu-Gly-Thr-Thr-Thr-Lys

(IIA) Ser-Gln-Leu-Glu-Thr-Pro-Glu-Thr-Leu-Leu-Gly-Ser-Thr-Glu-Glu-Lys-Pro-Leu

(IIB) Val-Phe-Cys-Thr

(IIC) Asn-Gln-Pro-Gln-Ala-Pro-Gly-Val-Glu-Ala-Ser-Gly-Ala-Gly-Glu-Ala

(IID) Leu-Pro-Ala-Gln-Val-Ala-Phe-X-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr-Cys

(IIE) Ile-X-Pro-Gly-Phe-Gly-Val-Ala-Tyr-Pro-Ala-Leu-Glu

5 (IIF) Leu-Cys-Ala-Pro

(IIG) Val-Pro-His-Leu-Pro-Ala-Asp

(IIH) Gly-Ser-Gln-Gly-Pro-Glu-Gln-Gln-X-X-Leu-Ile-X-Ala-Pro wobei X für einen Aminosäurerest steht, der nicht eindeutig bestimmt werden konnte.

Im Stand der Technik sind bereits TNF-BP durch eine N-terminale Teilsequenz charakterisiert worden
 10 [Europäische Patentanmeldung mit der Publikations-Nr. 308 378], wobei sich diese Sequenz von der erfindungsgemässen N-terminalen Teilsequenz gemäss Formel (IA) unterscheidet. Im übrigen handelt es sich aber bei den im Stand der Technik beschriebenen TNF-Bindeproteinen um aus dem Urin isolierten löslichen d.h. nicht membrangebundene, TNF-BP und nicht um membrangebundene, d.h. unlösliche, TNF-BP.

15 Gegenstand der vorliegenden Anmeldung sind auch Verfahren zur Isolierung der erfindungsgemässen TNF-BP. Diese Verfahren sind dadurch charakterisiert, dass man im wesentlichen die folgenden Reinigungsschritte nacheinander ausführt: Herstellung eines Zell- oder Gewebeextraktes, Immunaффinitätschromatographie und/oder ein- oder mehrfache Ligandenaffinitätschromatographie, hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und präparative SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Kombination der aus dem Stand der Technik bekannten einzelnen Reinigungsschritte ist für den Erfolg des
 20 erfindungsgemässen Verfahrens essentiell, wobei einzelne Schritte im Rahmen der zu lösenden Aufgabe modifiziert und verbessert wurden. So wurde beispielsweise der ursprünglich für die Anreicherung von TNF-BP aus humaner Placenta [31] verwendete kombinierte Immunaффinitätschromatographie/TNF- α -Ligandenaffinitätschromatographie-Schritt dadurch abgeändert, dass eine BSA-Sepharose 4B-Vorsäule verwendet wurde.
 25 Diese Vorsäule wurde zum Auftrag des Zell- oder Membranextraktes in Reihe mit der Immunaффinitätsäule und gefolgt von der Ligandenaffinitätsäule geschaltet. Nach Auftrag des Extraktes wurden die beiden zuletzt genannten Säulen abgekoppelt, jede für sich eluiert und die TNF-BP-aktiven Fraktionen wurden nochmals über eine Ligandenaffinitätsäule gereinigt. Erfindungswesentlich für die Durchführung des Umkehrphasen-HPLC-Schrittes ist die Verwendung eines Detergens-haltigen Lösungsmittelgemisches.

30 Ferner ist auch ein technisches Verfahren zum Erzielen hoher Zelldichten von Säugerzellen, aus denen TNF-BP isoliert werden können, Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ein solches Verfahren zeichnet sich dadurch aus, dass ein Medium, welches für die spezifischen Wachstumserfordernisse der verwendeten Zelllinie entwickelt wurde, in Verbindung mit einer wie z.B. im Detail in Beispiel 2 beschriebenen Perfusionsapparatur verwendet wird. Mittels eines solchen Verfahrens lassen sich beispielsweise für HL-60-
 35 Zellen bis zu mehr als 20-fach höhere Zelldichten als üblich erzielen.

Zusätzlich dazu betrifft die vorliegende Erfindung auch DNA-Sequenzen, die für Proteine und lösliche oder nichtlösliche Fragmente davon, die TNF binden, kodieren. Darunter sind beispielsweise DNA-Sequenzen zu verstehen, die für nichtlösliche Proteine oder lösliche wie nicht lösliche Fragmente davon, die TNF binden, kodieren, wobei solche DNA-Sequenzen aus den folgenden auswählbar sind:

- 40 (a) DNA-Sequenzen, wie sie in Figur 1 oder Figur 4 dargestellt sind, wie deren komplementäre Stränge, oder solche, die diese Sequenzen umfassen;
 (b) DNA-Sequenzen, die mit wie unter (a) definierten Sequenzen oder Fragmenten davon hybridisieren;
 (c) DNA-Sequenzen, die auf Grund der Entartung des genetischen Codes nicht mit Sequenzen, wie unter (a) und (b) definierte, hybridisieren, aber die für Polypeptide mit genau gleicher Aminosäuresequenz
 45 kodieren.

Das heisst, dass von der vorliegenden Erfindung nicht nur allelische Varianten, sondern auch solche DNA-Sequenzen umfasst sind, die sich durch Deletionen, Substitutionen und Additionen von einem oder mehreren Nukleotiden der in Figur 1 bzw. 4 dargestellten Sequenzen ergeben, wobei es sich bei den davon kodierten Proteinen nach wie vor um TNF-BP handelt. Eine Sequenz, die sich durch eine solche Deletion
 50 ergibt, ist beispielsweise in Science 248, 1019-1023, (1990) beschrieben.

Bevorzugt sind einmal solche DNA-Sequenzen, welche für ein solches Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 55 kD kodieren, wobei die in Abbildung 1 dargestellte Sequenz besonders bevorzugt ist, wie Sequenzen, die für nichtlösliche wie lösliche Fragmente von solchen Proteinen kodieren. Eine DNA-Sequenz, die beispielsweise für ein solches nichtlösliches Protein-Fragment kodiert, reicht von
 55 Nukleotid -185 bis 1122 der in Abbildung 1 gezeigten Sequenz. DNA-Sequenzen, die für lösliche Protein-Fragmente kodieren, sind beispielsweise solche, die von Nukleotid -185 bis 633 bzw. von Nukleotid -14 bis 633 der in Abbildung 1 gezeigten Sequenz reichen. Bevorzugt sind ebenfalls DNA-Sequenzen, die für ein Protein von etwa 75/85 kD kodieren, wobei solche, die die in Figur 4 dargestellte Partielle cDNA-Sequenzen

enthalten, bevorzugt sind. Besonders bevorzugte DNA-Sequenzen sind in diesem Fall die Sequenzen des offenen Leserasters von Nukleotid 2 bis 1'177. Die Peptide IIA, IIC, IIE, IIF, IIG und IIH werden von der partiellen cDNA-Sequenz in Figur 4 kodiert, wobei die geringfügigen Abweichungen der experimentell bestimmten Aminosäuresequenzen von der von der cDNA abgeleiteten Sequenz mit höchster Wahrscheinlichkeit auf der geringeren Auflösung der Gasphasen-Sequenzierung beruhen. Bevorzugt sind auch DNA-Sequenzen, die für nichtlösliche wie lösliche Fragmente von TNF-bindenden Proteinen mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 75 kD/65 kD kodieren. DNA-Sequenzen für solche löslichen Fragmente können auf Grund der Hydrophilieprofile der von den für solche nichtlöslichen TNF-BP kodierenden Nukleinsäuresequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen bestimmt werden.

Die Erfindung betrifft weiterhin DNA-Sequenzen, die eine Kombination aus zwei Teil-DNA-Sequenzen umfassen, wobei die eine Teilsequenz für solche löslichen Fragmente von nichtlöslichen Proteinen, die TNF binden kodiert (s.o.) und die andere Teil-Sequenz, für alle Domänen ausser der ersten Domäne der konstanten Region der schweren Kette von humanen Immunglobulinen, wie IgG, IgA, IgM bzw. IgE, kodiert.

Die vorliegende Erfindung betrifft natürlich auch die von solchen DNA-Sequenzen kodierten rekombinanten Proteine. Selbstverständlich sind dabei auch solche Proteine umfasst, in deren Aminosäuresequenzen, beispielsweise mittels gezielter Mutagenese, Aminosäuren so ausgetauscht worden sind, dass dadurch die Aktivität der TNF-BP oder deren Fragmente, nämlich die Bindung von TNF oder die Wechselwirkung mit anderen, an der Signalübertragung beteiligten Membrankomponenten, in einer gewünschten Art verändert oder erhalten wurden. Aminosäureaustausche in Proteinen und Peptiden, die im allgemeinen die Aktivität solcher Moleküle nicht verändern, sind im Stand der Technik bekannt und beispielsweise von H. Neurath und R.L. Hill in "The Proteins" (Academic Press, New York, 1979, siehe besonders Figur 6, Seite 14) beschrieben. Die am häufigsten vorkommenden Austausche sind: Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly, sowie solche in umgekehrter Weise. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Vektoren, die erfindungsgemässe DNA-Sequenzen enthalten und zur Transformation von geeigneten pro- wie eukaryotischen Wirtssystemen geeignet sind, wobei solche Vektoren bevorzugt sind, deren Verwendung zur Expression der von den erfindungsgemässen DNA-Sequenzen kodierten Proteine führt. Schliesslich betrifft die vorliegende Erfindung auch noch mit solchen Vektoren transformierte Pro- wie eukaryotische Wirtssysteme, wie Verfahren zur Herstellung von erfindungsgemässen rekombinanten Verbindungen durch Kultivierung solcher Wirtssysteme und anschliessende Isolierung dieser Verbindungen aus den Wirtssystemen selbst oder deren Kulturüberständen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch pharmazeutische Präparate, die wenigstens eines dieser TNF-BP oder Fragmente davon, gewünschtenfalls in Verbindung mit weiteren pharmazeutisch wirksamen Substanzen und/oder nicht-toxischen, inerten, therapeutisch verträglichen Trägermaterialien enthalten.

Die vorliegende Erfindung betrifft schliesslich die Verwendung solcher TNF-BP einerseits zur Herstellung pharmazeutischer Präparate bzw. andererseits zur Behandlung von Krankheiten, bevorzugt solchen, in deren Verlauf TNF involviert ist.

Ausgangsmaterial für die erfindungsgemässen TNF-BP sind ganz allgemein Zellen, die solche TNF-BP in membrangebundener Form enthalten und die dem Fachmann ohne Beschränkungen allgemein zugänglich sind, wie beispielsweise HL60- [ATCC Nr. CCL 240], U 937- [ATCC Nr. CRL 1593], SW 480- [ATCC Nr. CCL 228] und HEp2-Zellen [ATCC Nr. CCL 23]. Diese Zellen können nach bekannten Methoden des Standes der Technik [40] oder zum Erzielen hoher Zelldichten nach dem bereits allgemein und im Detail für HL60-Zellen in Beispiel 2 beschriebenen Verfahren kultiviert werden. TNF-BP können dann nach bekannten Methoden des Standes der Technik mittels geeigneter Detergenzien, beispielsweise Triton X-114, 1-O-n-Octyl- β -D-glucopyranosid (Octylglucosid), oder 3-[(3-Cholylamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propan sulfonat (CHAPS), im besonderen mittels Triton X-100, aus den aus dem Medium abzentrifugierten und gewaschenen Zellen extrahiert werden. Zum Nachweis solcher TNF-BP können die üblicherweise verwendeten Nachweismethoden für TNF-BP, beispielsweise eine Polyäthylenglykol-induzierte Fällung des ¹²⁵I-TNF/TNF-BP-Komplexes [27], im besonderen Filterbindungstests mit radioaktiv markiertem TNF gemäss Beispiel 1, verwendet werden. Zur Gewinnung der erfindungsgemässen TNF-BP können die generell zur Reinigung von Proteinen, insbesondere von Membranproteinen, verwendeten Methoden des Standes der Technik, wie beispielsweise Ionenaustausch-Chromatographie, Gelfiltration, Affinitätschromatographie, HPLC und SDS-PAGE verwendet werden. Besonders bevorzugte Methoden zur Herstellung erfindungsgemässer TNF-BP sind Affinitätschromatographie, insbesondere mit TNF- α als an die Festphase gebundenen Liganden und Immunaaffinitätschromatographie, HPLC und SDS-PAGE. Die Elution von mittels SDS-PAGE aufgetrennten TNF-BP Banden kann nach bekannten Methoden der Proteinchemie erfolgen, beispielsweise mittels Elektroelution nach Hunkapiller et al. [34], wobei nach heutigem Stand des Wissens die dort

angegebenen Elektro-Dialysezeiten generell zu verdoppeln sind. Danach noch verbleibende Spuren von SDS können dann gemäss Bosserhoff et al. [50] entfernt werden.

Die so gereinigten TNF-BP können mittels der im Stand der Technik bekannten Methoden der Peptidchemie, wie beispielsweise N-terminale Aminosäuresequenzierung oder enzymatische wie chemische Peptidspaltung charakterisiert werden. Durch enzymatische oder chemische Spaltung erhaltene Fragmente können nach gängigen Methoden, wie beispielsweise HPLC, aufgetrennt und selbst wieder N-terminal sequenziert werden. Solche Fragmente, die selbst noch TNF binden, können mittels der obengenannten Nachweismethoden für TNF-BP identifiziert werden und sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

10 Ausgehend von der so erhältlichen Aminosäuresequenzinformation oder den in Figur 1 wie Figur 4 dargestellten DNA- wie Aminosäuresequenzen können unter Beachtung der Degeneration des genetischen Codes nach im Stand der Technik bekannten Methoden geeignete Oligonukleotide hergestellt werden [51]. Mittels dieser können dann wiederum nach bekannten Methoden der Molekularbiologie [42,43] cDNA- oder genomische DNA-Banken nach Klonen, die für TNF-BP kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, 15 abgesucht werden. Ausserdem können mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [49] cDNA-Fragmente kloniert werden, indem von zwei auseinanderliegenden, relativ kurzen Abschnitten der Aminosäuresequenz unter Beachtung des genetischen Codes vollständig degenerierte und in ihrer Komplementarität geeignete Oligonukleotide als "Primer" eingesetzt werden, wodurch das zwischen diesen beiden Sequenzen liegende Fragment amplifiziert und identifiziert werden kann. Die Bestimmung der Nukleotidsequenz eines derartigen 20 Fragmentes ermöglicht eine unabhängige Bestimmung der Aminosäure-Sequenz des Proteinfragments, für das es kodiert. Die mittels der PCR erhältlichen cDNA-Fragmente können ebenfalls, wie bereits für die Oligonukleotide selbst beschrieben, nach bekannten Methoden zum Aufsuchen von für TNF-BP kodierende Nukleinsäuresequenzen enthaltenden Klonen aus cDNA- bzw. genomische DNA-Banken verwendet werden. Solche Nukleinsäuresequenzen können dann nach bekannten Methoden sequenziert werden [42]. Aufgrund 25 der so bestimmten wie der für bestimmte Rezeptoren bereits bekannten Sequenzen können solche Teilsequenzen, die für lösliche TNF-BP-Fragmente kodieren, bestimmt und mittels bekannter Methoden aus der Gesamtsequenz herausgeschnitten werden [42].

Die gesamte Sequenz oder solche Teilsequenzen können dann mittels bekannter Methoden in im Stand der Technik beschriebene Vektoren zu deren Vervielfältigung wie Expression in Prokaryoten integriert 30 werden [42]. Geeignete Prokaryotische Wirtsorganismen stellen beispielsweise gram-negative wie gram-Positive Bakterien, wie beispielsweise E. coli Stämme, wie E. coli HB 101 [ATCC Nr. 33 694] oder E. coli W3110 [ATCC Nr. 27 325] oder B. subtilis Stämme dar.

Weiterhin können erfindungsgemässe Nukleinsäuresequenzen, die für TNF-BP sowie für TNF-BP-Fragmente kodieren, in geeignete Vektoren zur Vermehrung wie Expression in eukaryotischen Wirtszellen, 35 wie beispielsweise Hefe, Insekten- und Säugerzellen, mittels bekannter Methoden integriert werden. Expression solcher Sequenzen erfolgt bevorzugt in Säuger- wie Insektenzellen.

Ein typischer Expressionsvektor für Säugerzellen enthält ein effizientes Promotorelement, um eine gute Transkriptionsrate zu erzielen, die zu exprimierende DNA-Sequenz und Signale für eine effiziente Termination und Polyadenylierung des Transkripts. Weitere Elemente, die verwendet werden können, sind 40 "Enhancer", welche zu nochmals verstärkter Transkription führen und Sequenzen, welche z.B. eine längere Halbwertszeit der mRNA bewirken können. Zur Expression von Nukleinsäuresequenzen, denen das endogene für ein Signalpeptid kodierende Sequenzstück fehlt, können Vektoren verwendet werden, die solche geeignete Sequenzen, die für Signalpeptide von anderen bekannten Proteinen kodieren, enthalten. Siehe beispielsweise der von Cullen, B.R. in Cell 48, 973-982 (1986) beschriebene Vektor pLJ268 oder auch bei 45 Sharma, S. et al. in "Current Communications in Molecular Biology", ed. by Gething, M.J., Cold Spring Harbor Lab. (1985), Seiten 73-78.

Die meisten Vektoren, die für eine transiente Expression einer bestimmten DNA-Sequenz in Säugerzellen verwendet werden, enthalten den Replikationsursprung des SV40 Virus. In Zellen, die das T-Antigen des Virus exprimieren, (z.B. COS-Zellen), werden diese Vektoren stark vermehrt. Eine vorübergehende Expression ist aber nicht auf COS-Zellen beschränkt. Im Prinzip kann jede transfektierbare Säugerzelllinie hierfür 50 verwendet werden. Signale, die eine starke Transkription bewirken können, sind z.B. die frühen und späten Promotoren von SV40, der Promoter and Enhancer des "major immediate-early" Gens des HCMV (humaner Cytomegalovirus), die LTRs ("long terminal repeats") von Retroviren, wie beispielsweise RSV, HIV und MMTV. Es können aber auch Signale von zellulären Genen, wie z.B. die Promotoren des Aktin- 55 und Collagenase-Gens, verwendet werden.

Alternativ können aber auch stabile Zelllinien, die die spezifische DNA-Sequenz im Genom (Chromosom) integriert haben, erhalten werden. Hierzu wird die DNA-Sequenz zusammen mit einem selektierbaren Marker, z.B. Neomycin, Hygromycin, Dihydrofolat-Reduktase (dhfr) oder Hypoxanthin-

Guanin-Phosphoribosyltransferase (hgpt) kotransfiziert. Die stabil ins Chromosom eingebaute DNA-Sequenz kann auch noch stark vermehrt werden. Ein geeigneter Selektionsmarker hierfür ist beispielsweise die Dihydrofolat-Reduktase (dhfr). Säugerzellen (z.B. CHO-Zellen), welche kein intaktes dhfr-Gen enthalten, werden hierbei nach erfolgter Transfektion mit steigenden Mengen von Methotrexat inkubiert. Auf diese Weise können Zelllinien erhalten werden, welche mehr als tausend Kopien der gewünschten DNA-Sequenz enthalten.

Säugerzellen, welche für die Expression verwendet werden können, sind z.B. Zellen der menschlichen Zelllinien Hela [ATCC CCL2] und 293 [ATCC CRL 1573], sowie 3T3- [ATCC CCL 163] und L-Zellen, z.B. [ATCC CCL 149], (CHO)-Zellen [ATCC CCL 81], BHK [ATCC CCL 10]-Zellen sowie die CV 1 [ATCC CCL 70]- und die COS-Zelllinien [ATCC CRL 1650, CRL 1651].

Geeignete Expressionsvektoren umfassen beispielsweise Vektoren wie pBC12MI [ATCC 67 109], pSV2dhfr [ATCC 37 148], pSVL [Pharmacia, Uppsala, Sweden], pRSVCat [ATCC 37 152] und pMSG [Pharmacia, Uppsala, Sweden]. Besonders bevorzugte Vektoren sind die in Beispiel 9 verwendeten Vektoren "pK19" und "pN123". Diese können aus den mit ihnen transformierten E. coli-Stämmen HB101(pK19) und HB101(pN123) nach bekannten Methoden isoliert werden [42]. Diese E. coli-Stämme wurden am 26. Januar 1990 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig, BRD unter DSM 5761 für HB101(pK19) und DSM 5764 für HB101(pN123) hinterlegt. Zur Expression der Proteine, die aus einem löslichen Fragment von nichtlöslichen TNF-BP und einem Immunglobulinanteil, d.h. allen Domänen ausser der ersten der konstanten Region der schweren Kette, bestehen, eignen sich besonders pSV2 abgeleitete Vektoren wie beispielsweise von German, C. in "DNA Cloning" [Vol. II., edt von Glover, D.M., IRL Press, Oxford, 1985] beschrieben. Besonders bevorzugte Vektoren sind die bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig, BRD hinterlegten und in der Europäischen Patentanmeldung Nr. 90107393.2 genau beschriebenen Vektoren pCD4-Hu (DSMZ 5315), pCD4-Hu1 (DSMZ 5314) und pCD4-Hu3 (DSMZ 5523). Besagte Europäische Patentschrift wie die in Beispiel 11 angegebenen äquivalenten Anordnungen enthalten auch Angaben bezüglich der weiteren Verwendung dieser Vektoren zur Expression von chimären Proteinen (siehe auch Beispiel 11) wie zur Konstruktion von Vektoren für die Expression von solchen chimären Proteinen mit anderen Immunglobulinanteilen.

Die Art und Weise wie die Zellen transfiziert werden hängt vom gewählten Expressions- und Vektorsystem ab. Eine Uebersicht über diese Methoden findet man z.B. bei Pollard et al., "DNA Transformation of Mammalian Cells" in "Methods in Molecular Biology" [Nucleic Acids Vol. 2, 1984, Walker, J.M., ed, Humana, Clifton, New Jersey]. Weitere Methoden findet man bei Chen und Okayama ["High-Efficiency Transformation of Mammalian Cells by Plasmid DNA", Molecular and Cell Biology 7, 2745-2752, 1987] und bei Felgner [Felgner et al., "Lipofectin: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure", Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417, 1987].

Zur Expression in Insektenzellen kann das Baculovirus-Expressions-System, welches schon für die Expression einer Reihe von Proteinen erfolgreich eingesetzt worden ist (für eine Uebersicht siehe Luckow and Summers, Bio/Technology 6, 47-55, 1988), verwendet werden. Rekombinante Proteine können authentisch oder als Fusionsproteine hergestellt werden. Die so hergestellten Proteine können auch modifiziert, wie beispielsweise glykosyliert (Smith et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82, 8404-8408, 1987) sein. Für die Herstellung eines rekombinanten Baculovirus, der das gewünschte Protein exprimiert, verwendet man einen sogenannten "Transfervektor". Hierunter versteht man ein Plasmid, welches die heterologe DNA-Sequenz unter der Kontrolle eines starken Promoters, z.B. dem des Polyhedringens, enthält, wobei diese auf beiden Seiten von viralen Sequenzen umgeben ist. Besonders bevorzugte Vektoren sind die in Beispiel 10 verwendeten Vektoren "pN113", "pN119" und "pN124". Diese können aus den mit ihnen transformierten E. coli-Stämmen HB101(pN113), HB101(pN119) und HB101(pN124) nach bekannten Methoden isoliert werden [42]. Diese E. coli-Stämme wurden am 26. Januar 1990 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig, BRD, unter DSM 5762 für HB101(pN113), DSM 5763 für HB101(pN119) und DSM 5765 für HB101(pN124) hinterlegt. Der Transfervektor wird dann zusammen mit DNA des Wildtyp-Baculovirus in die Insektenzellen transfiziert. Die in den Zellen durch homologe Rekombination entstehenden rekombinanten Viren können dann nach bekannten Methoden identifiziert und isoliert werden. Eine Uebersicht über das Baculovirus-Expressionssystem und der dabei verwendeten Methoden findet man bei Luckow und Summers [52].

Exprimierte TNF-BP wie ihre nichtlöslichen oder löslichen Fragmente können dann nach im Stand der Technik bekannten Methoden der Proteinchemie, wie beispielsweise den bereits auf Seiten 5-6 beschriebenen Verfahrenen aus der Zellmasse oder den Kulturüberständen gereinigt werden.

Die erfindungsgemäss erhaltenen TNF-BP können auch als Antigene zur Erzeugung von poly- und monoklonalen Antikörpern nach bekannten Methoden der Technik [44,45] oder gemäss dem in Beispiel 3

beschriebenen Verfahren verwendet werden. Solche Antikörper, insbesondere monoklonale Antikörper gegen die 75 kD-TNF-BP-Spezies, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Solche gegen die 75 kD TNF-BP gerichtete Antikörper können durch dem Fachmann geläufige Modifikationen des in den Beispielen 4-6 im Detail beschriebenen Reinigungsverfahrens zur Isolierung von TNF-BP eingesetzt werden.

5 Auf Grund der hohen Bindungsaffinität erfindungsgemässer TNF-BP für TNF (K_d -Werte in den Größenordnungen von 10^{-9} - 10^{-10} M) können diese oder Fragmente davon als Diagnostika zum Nachweis von TNF in Serum oder anderen Körperflüssigkeiten nach im Stand der Technik bekannten Methoden, beispielsweise in Festphasenbindungstests oder in Verbindung mit Anti-TNF-BP-Antikörpern in sogenannten "Sandwich"-Tests, eingesetzt werden.

10 Im übrigen können erfindungsgemässe TNF-BP einerseits zur Reinigung von TNF und andererseits zum Auffinden von TNF-Agonisten sowie TNF-Antagonisten nach im Stand der Technik bekannten Verfahren verwendet werden.

Die erfindungsgemässen TNF-BP sowie deren physiologisch verträgliche Salze, die nach im Stand der Technik bekannten Methoden hergestellt werden können, können auch zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten, vor allem solchen zur Behandlung von Krankheiten, bei deren Verlauf TNF involviert ist, verwendet werden. Dazu kann eine oder mehrere der genannten Verbindungen, falls wünschenswert bzw. erforderlich in Verbindung mit anderen pharmazeutisch aktiven Substanzen, mit den üblicherweise verwendeten festen oder flüssigen Trägermaterialien in bekannter Weise verarbeitet werden. Die Dosierung solcher Präparate kann unter Berücksichtigung der üblichen Kriterien in Analogie zu bereits verwendeten Präpara-

20 ten ähnlicher Aktivität und Struktur erfolgen.
Nachdem die Erfindung vorstehend allgemein beschrieben worden ist, sollen die folgenden Beispiele Einzelheiten der Erfindung veranschaulichen, ohne dass diese dadurch in irgendeiner Weise eingeschränkt wird.

25

Beispiel 1

30 Nachweis von TNF-bindenden Proteinen

Die TNF-BP wurden in einem Filtertest mit humanem radio-jodiertem 125 I-TNF nachgewiesen. TNF (46,47) wurde mit Na^{125}I (IMS40, Amersham, Amersham, England) und Iodo-Gen (#28800, Pierce Eurochemie, Oud-Beijerland, Niederlande) nach Fraker und Speck [48] radioaktiv markiert. Zum Nachweis
35 der TNF-BP wurden isolierte Membranen der Zellen oder ihre solubilisierten, angereicherten und gereinigten Fraktionen auf angefeuchtete Nitrocellulose-Filter (0.45 μ , BioRad, Richmond, California, USA) aufgetragen. Die Filter wurden dann in Pufferlösung mit 1% entfettetem Milchpulver blockiert und anschliessend mit $5 \cdot 10^5$ cpm/ml 125 I-TNF α ($0.3\text{--}1.0 \cdot 10^6$ cpm/ μ g) in zwei Ansätzen mit und ohne Beigabe von 5 μ g/ml nicht-markiertem TNF α inkubiert, gewaschen und luftgetrocknet. Die gebundene Radioaktivität wurde autoradiographisch semiquantitativ nachgewiesen oder in einem γ -Counter gezählt. Die spezifische 125 I-TNF- α -
40 Bindung wurde nach Korrektur für unspezifische Bindung in Anwesenheit von unmarkiertem TNF- α im Ueberschuss ermittelt. Die spezifische TNF-Bindung im Filtertest wurde bei verschiedenen TNF-Konzentrationen gemessen und nach Scatchard analysiert [33], wobei ein K_d -Wert von $\sim 10^{-9}$ - 10^{-10} M ermittelt wurde.

45

Beispiel 2

50 Zellextrakte von HL-60-Zellen

HL60 Zellen [ATCC-Nr. CCL 240] wurden in experimentellem Labormasstab in einem RPMI 1640-Medium [GIBCO-Katalog Nr. 074-01800], das noch 2 g/l NaHCO_3 und 5% fötales Kälberserum enthält, in einer 5% CO_2 -Atmosphäre kultiviert und anschliessend zentrifugiert.

55 Zum Erzielen hoher Zelldichten in technischem Masstab wurde folgendermassen verfahren. Die Züchtung wurde in einem 75 l Airlifftermenter (Fa. Chemap, Schweiz) mit 58 l Arbeitsvolumen durchgeführt. Hierfür wurde das Kassettenmembransystem "PROSTAK" (Millipore, Schweiz) mit einer Membranfläche von 0.32 m^2 (1 Kassette) in den äusseren Zirkulationskreislauf integriert. Das Kulturmedium (siehe Tabelle

1) wurde mit einer Watson-Marlow Pumpen TYP 603U, mit 5 l/min. umgepumpt. Nach einer Dampfsterilisation der Anlagen wobei das "PROSTAK" System im Autoklaven separat sterilisiert wurde, wurde die Fermentation mit wachsenden HL-60 Zellen aus einem 20 l Airliftfermenter (Chemap) gestartet. Die Zellzüchtung im Impffermenter erfolgte im konventionellen Batchverfahren in dem Medium gemäss Tabelle 1 und einem Startzelltiter von 2×10^5 Zellen/ml. Nach 4 Tagen wurde der HL60 Ansatz mit einem Titer von $4,9 \times 10^5$ Zellen/ml in den 75 l Fermenter überführt. Der pH-Wert wurde bei 7,1 und der pO_2 Wert bei 25% Sättigung gehalten, wobei der Sauerstoffeintrag durch eine mikroporöse Fritte erfolgte. Nach anfänglicher Batchfermentation wurde am 2. Tag die Perfusion bei einem Zelltiter von 4×10^5 Zellen/ml mit 30 l Mediumsaustausch Pro Tag gestartet. Auf der Filtratseite der Membran wurde das konditionierte Medium abgezogen und durch den Zulauf von frischem Medium ersetzt. Das Zulaufmedium wurde wie folgt verstärkt: Primatone von 0,25% auf 0,35%, Glutamin von 5 mM auf 8 mM und Glucose von 4 g/l auf 6 g/l. Die Perfusionsrate wurde dann am 3. und 4. Tag auf 72 l Medium/Tag und am 5. Tag auf 100 l Medium/Tag erhöht. Nach 120 Stunden der kontinuierlichen Züchtung wurde die Fermentation beendet. Unter den gegebenen Fermentationsbedingungen erfolgte exponentielles Zellwachstum bis 40×10^5 Zellen/ml. Die Verdopplungszeit der Zellpopulation betrug bis 10×10^5 Zellen/ml 20-22 Stunden und stieg dann mit zunehmender Zelldichte auf 30-36 Stunden an. Der Anteil der lebenden Zellen lag während der gesamten Fermentationszeit bei 90-95%. Der HL-60 Ansatz wurde dann im Fermenter auf ca. 12°C heruntergeköhlt und die Zellen durch Zentrifugation (Beckman-Zentrifuge [Modell J-6B, Rotor JS], 3000 rpm, 10 min., 4°C) geerntet.

Tabelle 1HL-60 Medium

Komponenten

Konzentrationen

mg/l

 CaCl_2 (wasserfrei)

112,644

 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

20

 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $0,498 \cdot 10^{-3}$ $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$

0,02

 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,1668

KCl

336,72

 KNO_3

0,0309

 MgCl_2 (wasserfrei)

11,444

	MgSO ₄ (wasserfrei)	68,37
	NaCl	5801,8
5	Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	188,408
	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	75
	Na ₂ SeO ₃ · 5H ₂ O	9,6 · 10 ⁻³
10	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,1726
	D-Glucose	4000
	Glutathion (red.)	0,2
15	Hepes-Puffer	2383,2
	Hypoxanthin	0,954
	Linolsäure	0,0168
20	Liponsäure	0,042
	Phenolrot	10,24
	Putrescin 2HCl	0,0322
25	Na-Pyruvat	88
	Thymidin	0,146
	Biotin	0,04666
	D-Ca-Pantothenat	2,546
30	Cholinchlorid	5,792
	Folsäure	2,86
	i-Inositol	11,32
35	Niacinamid	2,6
	Nicotinamid	0,0074
	para-Aminobenzoessäure	0,2
	Pyridoxal HCl	2,4124
40	Pyridoxin HCl	0,2
	Riboflavin	0,2876
	Thiamin HCl	2,668
45	Vitamin B ₁₂	0,2782
	L-Alanin	11,78
50	L-Asparaginsäure	10
	L-Asparagin H ₂ O	14,362
	L-Arginin	40
	L-Arginin HCl	92,6
55	L-Aspartat	33,32

	L-Cystin 2HCl	62,04
5	L-Cystein HCl·H ₂ O	7,024
	L-Glutaminsäure	36,94
	L-Glutamin	730
10	L-Glycin	21,5
	L-Histidin	3
	L-Histidin HCl·H ₂ O	27,392
15	L-Hydroxypyrolin	4
	L-Isoleucin	73,788
	L-Leucin	75,62
	L-Lysin HCl	102,9
20	L-Methionin	21,896
	L-Phenylalanin	43,592
	L-Prolin	26,9
25	L-Serin	31,3
	L-Threonin	53
	L-Tryptophan	11,008
30	L-Tyrosin·2Na	69,76
	L-Valin	62,74
	Penicillin/Streptomycin	100 U/ml
35	Insulin (human)	5 µg/ml
	Tranferrin (human)	15 µg/ml
	Rindereserumalbumin	67 µg/ml
40	Primateone RL (Sheffield Products, Norwich NY, USA)	0,258
	Pluronic F68 (Serva, Heidelberg, BRD)	0,018
45	Fötales Kälberserum	0,3-38

Das Zentrifugat wurde mit isotonem Phosphatpuffer (PBS; 0,2 g/l KCl, 0,2 g/l KH₂PO₄, 8,0 g/l NaCl, 2,16 g/l Na₂HPO₄ · 7H₂O), der mit 5% Dimethylformamid, 10 mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin, 10 µM Leupeptin, 1 µM Pepstatin, 1 mM o-Phenanthrolin, 5 mM Jodacetamid, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid versetzt war (im folgenden als PBS-M bezeichnet), gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden bei einer Dichte von 2,5 · 10⁹ Zellen/ml in PBS-M mit Triton X-100 (Endkonzentration 1,0%) extrahiert. Der Zellextrakt wurde durch Zentrifugation geklärt (15'000 x g, 1 Stunde; 100'000 x g, 1 Stunde).

Beispiel 3

Herstellung von monoklonalen (TNF-BP)-Antikörpern

Ein gemäss Beispiel 2 erhaltener Zentrifugationsüberstand aus Kultivierung von HL60-Zellen im experimentellen Labormasstab wurde im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt. Der verdünnte Überstand wurde bei 4°C auf eine Säule aufgetragen (Flussrate: 0,2 ml/min.), die 2 ml Affigel 10 enthielt (Bio Rad Katalog Nr. 153-6099), an das 20 mg rekombinantes humanes TNF- α [Pennica, D. et al. (1984) Nature 312, 724; Shirai, T. et al. (1985) Nature 313, 803; Wang, A.M. et al. (1985) Science 228, 149] gemäss den Empfehlungen des Herstellers gekoppelt worden war. Die Säule wurde bei 4°C und einer Durchflussrate von 1 ml/min zuerst mit 20 ml PBS, das 0,1% Triton X 114 enthielt und danach mit 20 ml PBS gewaschen. So angereichertes TNF-BP wurde bei 22°C und einer Flussrate von 2 ml/min mit 4 ml 100 mM Glycin, pH 2,8, 0,1% Decylmaltosid eluiert. Das Eluat wurde in einer Centricon 30 Einheit [Amicon] auf 10 μ l konzentriert.

10 μ l dieses Eluates wurden mit 20 μ l vollständigem Freundschens Adjuvans zu einer Emulsion gemischt. Je 10 μ l der Emulsion wurden gemäss dem von Holmdahl, R. et al. [(1985), J. Immunol. Methods 83 379] beschriebenen Verfahren an den Tagen 0, 7 und 12 in eine hintere Fusspfote einer narkotisierten Balb/c-Maus injiziert.

Am Tag 14 wurde die immunisierte Maus getötet, der popliteale Lymphknoten herausgenommen, zerkleinert und in Iscove's Medium (IMEM, GIBCO Katalog Nr. 074-2200), das 2 g/l NaHCO₃ enthielt, durch wiederholtes Pipettieren suspendiert. Gemäss einem modifizierten Verfahren von De St.Groth und Scheidegger [J. Immunol. Methods (1980), 35, 1] wurden 5x10⁷ Zellen des Lymphknotens mit 5x10⁷ PAI Maus-Myelomazellen (J.W. Stocker et al., Research Disclosure, 217, Mai 1982, 155-157), die sich in logarithmischem Wachstum befanden, fusioniert. Die Zellen wurden gemischt, durch Zentrifugation gesammelt und durch leichtes Schütteln in 2 ml 50% (v/v) Polyethylenglycol in IMEM bei Raumtemperatur resuspendiert und durch langsame Zugabe von 10 ml IMEM während 10 Minuten vorsichtigen Schüttelns verdünnt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt und in 200 ml vollständigem Medium [IMEM + 20% fötales Kälberserum, Glutamin (2,0 mM), 2-Mercaptoethanol (100 μ M), 100 μ M Hypoxanthine, 0,4 μ M Aminopterin und 16 μ M Thymidine (HAT)] resuspendiert. Die Suspension wurde auf 10 Gewebekulturschalen, die jeweils 96 Vertiefungen enthielten, verteilt und ohne Wechsel des Mediums bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 98% 11 Tage lang inkubiert.

Die Antikörper zeichnen sich aus durch ihre inhibierende Wirkung auf die TNF-Bindung an HL60-Zellen oder durch ihre Bindung an Antigen im Filtertest gemäss Beispiel 1. Zum Nachweis der biologischen Aktivität von anti(TNF-BP)-Antikörpern wurde folgendermassen verfahren: 5x10⁶ HL60 oder U937-Zellen wurden in vollständigem RPMI 1640 Medium zusammen mit affinitätsgereinigten monoklonalen anti-(TNF-BP)-Antikörpern oder Kontrollantikörpern (d.h. solchen, die nicht gegen TNF-BP gerichtet sind) in einem Konzentrationsbereich von 1 ng/ml bis 10 μ g/ml inkubiert. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C wurden die Zellen durch Zentrifugation gesammelt und mit 4,5 ml PBS bei 0°C gewaschen. Sie wurden in 1 ml vollständigem RPMI 1640 Medium (Beispiel 2), das zusätzlich 0,1% Natriumazid und ¹²⁵I-TNF α (10⁶ cpm/ml) mit oder ohne Beigabe von unmarkiertem TNF α (s.o.) enthielt, resuspendiert. Die spezifische Radioaktivität des ¹²⁵I-TNF α betrug 700 Ci/mmol. Die Zellen wurden 2 Stunden bei 4°C inkubiert, gesammelt und 4 mal mit 4,5 ml PBS, das 1% BSA und 0,001% Triton X 100 (Fluka) enthielt, bei 0°C gewaschen. Die an die Zellen gebundene Radioaktivität wurde in einem γ -Scintillations-zähler gemessen. In einem vergleichbaren Experiment wurde die zellgebundene Radioaktivität von Zellen, die nicht mit anti-(TNF-BP)-Antikörpern behandelt worden waren, bestimmt (ungefähr 10 000 cpm/5x10⁶ Zellen).

45

Beispiel 450 Affinitätschromatographie

Für die weitere Reinigung wurden jeweils ein gemäss Beispiel 3 erhaltener monoklonaler anti-(55 kD TNF-BP)-Antikörper (2,8 mg/ml Gel), TNF α (3,0 mg/ml Gel) und Finderserumalbumin (BSA, 8,5 mg/ml Gel) gemäss den Vorschriften des Herstellers kovalent an CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia, Uppsala, Schweden) gekoppelt. Der gemäss Beispiel 2 erhaltene Zellextrakt wurde über die so hergestellten und in der folgenden Reihenfolge hintereinandergeschalteten Säulen geleitet: BSA-Sepharose-Vorsäule, Immunaaffinitätssäule [Anti-(55 kD-TNF-BP)-Antikörper], TNF α -Ligand-Affinitätssäule. Nach vollständigem Auftrag wurden die beiden letztgenannten Säulen abgetrennt und einzeln für sich mit je 100 ml der folgenden

Pufferlösungen gewaschen: (1) PBS, 1,0% Triton X-100, 10 mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin; (2) PBS, 0,1% Triton X-100, 0,5M NaCl, 10 mM ATP, 10 mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin; und (3) PBS, 0,1% Triton X-100, 10 mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin. Sowohl die Immun- als auch die TNF α -Ligand-Affinitätssäule wurden dann mit 100 mM Glycin pH 2,5, 100 mM NaCl, 0,2% Decylmaltoside, 10 mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin jede für sich eluiert. Die im Filtertest gemäss Beispiel 1 aktiven Fraktionen jeder Säule wurden danach jeweils vereint und mit 1M Tris pH 8,0 neutralisiert.

Die so vereinten TNF-BP-aktiven Fraktionen der Immun-Affinitätschromatographie einerseits und der TNF α -Ligand-Affinitätschromatographie andererseits wurden zur weiteren Reinigung nochmals auf je eine kleine TNF α -Ligand-Affinitätssäule aufgetragen. Danach wurden diese beiden Säulen mit je 40 ml von (1) PBS, 1,0% Triton X-100, 10 mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin, (2) PBS, 0,1% Triton X-100, 0,5M NaCl, 10 mM ATP, 10 mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin, (3) PBS, 0,1% Triton X-100, (4) 50 mM Tris PH 7,5, 150 mM NaCl, 1,0% NP-40, 1,0% Desoxycholat, 0,1% SDS, (5) PBS, 0,2% Decylmaltosid gewaschen. Anschliessend wurden die Säulen mit 100 mM Glycin pH 2,5, 100 mM NaCl, 0,2% Decylmaltosid eluiert. Fraktionen von 0,5 ml von jeder Säule wurden für sich gesammelt und die gemäss Filtertest (Beispiel 1) aktiven Fraktionen von jeder Säule jeweils für sich vereint und in einer Centricon-Einheit (Amicon, Molekulargewichts-Ausschluss 10'000) aufkonzentriert.

Beispiel 5

20

Auftrennung mittels HPLC

Die gemäss Beispiel 4 erhaltenen aktiven Fraktionen wurden gemäss ihrer unterschiedlichen Herkunft (Immun- bzw. Ligand-Affinitätschromatographie) jeweils für sich auf C1/C8 Umkehrphasen-HPLC-Säulen (ProRPC, Pharmacia, 5x20 mm), die mit 0,1% Trifluoressigsäure, 0,1% Octylglucosid equilibriert worden waren, aufgetragen. Die Säulen wurden dann mit einem linearen Acetonitril-Gradienten (0-80%) im gleichen Puffer bei einem Fluss von 0,5 ml/min eluiert. Fraktionen von 1,0 ml wurden von jeder Säule gesammelt und die aktiven Fraktionen von jeder Säule für sich vereint (Nachweis gemäss Beispiel 1).

Beispiel 6

35

Auftrennung mittels SDS-PAGE

Die gemäss Beispiel 5 erhaltenen und gemäss Filtertest (Beispiel 1) aktiven Fraktionen wurden durch SDS-PAGE gemäss [34] weiter aufgetrennt. Dazu wurden die Proben in SDS-Probenpuffer während 3 Minuten auf 95°C erhitzt und anschliessend auf einem 12% Acrylamid-Trenngel mit einem 5%igen Sammelgel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Referenz zur Bestimmung der scheinbaren Molekulargewichte auf dem SDS-PAGE Gel wurden die folgenden Eichproteine verwendet: Phosphorylase B (97,4 kD), BSA (66,2 kD), Ovalbumin (42,7 kD), Carboanhydrase (31,0 kD), Soya Trypsin-Inhibitor (21,5 kD) und Lysozym (14,4 kD).

Unter den genannten Bedingungen wurden für Proben, die gemäss Beispiel 4 durch TNF α -Ligandenaffinitätschromatographie von Immunaaffinitätschromatographieeluat erhalten und durch HPLC gemäss Beispiel 5 weiter aufgetrennt worden waren, zwei Banden von 55 kD und 51 kD sowie drei schwächere Banden von 38 kD, 36 kD und 34 kD erhalten. Diese Banden wurden in einem Mini Trans Blot System (BioRad, Richmond, California, USA) elektrophoretisch während 1 Stunde bei 100 V in 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol auf eine PVDF-Membran (Immobilon, Millipore, Bedford, Mass. USA) transferiert. Danach wurde die PVDF-Membran entweder mit 0,15% Serva-Blau (Serva, Heidelberg, BRD) in Methanol/Wasser/Eisessig (50/40/10 Volumenteile) auf Protein gefärbt oder mit entfettetem Milchpulver blockiert und anschliessend zum Nachweis von Banden mit TNF-BP-Aktivität mit ¹²⁵I-TNF α gemäss den in Beispiel 1 beschriebenen Filtertestbedingungen inkubiert. Dabei zeigte sich, dass alle in der Proteinfärbung zur Darstellung gelangten Banden spezifisch TNF α banden. Alle diese Banden banden im Western Blot nach Towbin et al. [38] auch den gemäss Beispiel 3 hergestellten monoklonalen Anti-55kD-TNF-BP-Antikörper. Dabei wurde ein gemäss dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren mit Na¹²⁵I radioaktiv

markierter, affinitätsgereinigter (Mausimmunglobulin-Sepharose-4B-Affinitätssäule) Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper zum autoradiographischen Nachweis dieses Antikörpers eingesetzt.

Proben, die gemäss Beispiel 4 durch zweimalige TNF- α -Ligandenaffinitätschromatographie des Durchlaufs der Immunaaffinitätschromatographie erhalten und durch HPLC gemäss Beispiel 5 weiter aufgetrennt worden waren, zeigten unter den oben spezifizierten SDS-PAGE- und Blottransfer-Bedingungen zwei zusätzliche Banden von 75 kD und 65 kD, die beide im Filtertest (Beispiel 1) spezifisch TNF banden. Im Western Blot gemäss Towbin et al. (s.o.) reagierten die Proteine dieser beiden Banden nicht mit dem gemäss Beispiel 3 hergestellten anti-(55 kD TNF-BP)-Antikörper. Sie reagierten allerdings mit einem monoklonalen Antikörper, der ausgehend von der 75 kD-Bande (anti-75 kD TNF-BP-Antikörper) gemäss Beispiel 3 erzeugt worden war.

Beispiel 7

15

Aminosäuresequenzanalyse

Zur Aminosäuresequenzanalyse wurden die gemäss Beispiel 5 erhaltenen und gemäss Filtertest (Beispiel 1) aktiven Fraktionen mittels der in Beispiel 6 beschriebenen, nun jedoch reduzierenden, SDS-PAGE Bedingungen (SDS-Probenpuffer mit 125 mM Dithiothreitol) aufgetrennt. Es wurden die gleichen Banden wie gemäss Beispiel 6 gefunden, die allerdings auf Grund der reduzierenden Bedingungen der SDS-PAGE im Vergleich zu Beispiel 6 alle um etwa 1-2 kD höhere Molekulargewichte zeigten. Diese Banden wurden dann gemäss Beispiel 6 auf PVDF-Membranen übertragen und mit 0,15% 35 Serva-Blau in Methanol/Wasser/Eisessig (50/40/10 Volumenteile) während 1 Minute gefärbt, mit Methanol/Wasser/Eisessig (45/48/7 Volumenteile) entfärbt, mit Wasser gespült, luftgetrocknet und danach ausgeschnitten. Bei sämtlichen Schritten wurden zur Vermeidung von N-terminaler Blockierung die von Hunkapiller [34] angegebenen Bedingungen eingehalten. Zunächst wurden die gereinigten TNF-BP unverändert zur Aminosäuresequenzierung eingesetzt. Um zusätzliche Sequenzinformation zu erhalten, wurden die TNF-BP nach Reduktion und S-Carboxymethylierung [Jones, B.N. (1988) in "Methods of Protein Microcharacterisation", J.E. Shively, ed., Humana Press, Clifton NJ, 124-125] mit Bromcyan (Tarr, G.E. in "Methods of Protein Microcharacterisation", 165-166, op.cit.), Trypsin und/oder Proteinase K gespalten und die Peptide mittels HPLC nach bekannten Methoden der Proteinchemie aufgetrennt. So vorbereitete Proben wurden dann in einem automatisierten Gasphasen-Mikrosequenzier-Gerät (Applied Biosystems Modell 470A, ABI, Foster City, Calif., USA) mit einem on-line nachgeschalteten automatisierten HPLC PTH-Aminosäureanalysator (Applied Biosystems Modell 120, ABI s.o.) sequenziert, wobei die folgenden Aminosäuresequenzen bestimmt wurden:

- 1., Für die 55 kD-Bande (gemäss nichtreduzierender SDS-PAGE):
 Leu-Val-Pro-His-Leu-Gly-Asp-Arg-Glu-Lys-Arg-Asp-Ser-Val-Cys-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-X-Asn-Ser-Ile,
 und
 Ser-Thr-Pro-Glu-Lys-Glu-Gly-Glu-Leu-Glu-Gly-Thr-Thr-Thr-Lys
 wobei X für einen Aminosäurerest steht, der nicht bestimmt werden konnte.
- 2., Für die 51 kD und die 38 kD-Banden (gemäss nichtreduzierender SDS-PAGE):
 Leu-Val-Pro-His-Leu-Gly-Asp-Arg-Glu
- 3., Für die 65 kD-Bande (gemäss nichtreduzierender SDS-PAGE): Bei der N-terminalen Sequenzierung der 65 kD Bande wurden bis zum 15. Rest ohne Unterbrechung zwei parallele Sequenzen ermittelt. Da eine der beiden Sequenzen einer Teilsequenz des Ubiquitins [36,37] entsprach, wurde für die 65 kD-Bande die folgende Sequenz abgeleitet:
 Leu-Pro-Ala-Gln-Val-Ala-Phe-X-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr-Cys.
 wobei X für einen Aminosäurerest steht, der nicht bestimmt werden konnte.
 Weitere Peptidsequenzen für 75(65)kDa-TNF-BP wurden bestimmt:
 Ile-X-Pro-Gly-Phe-Gly-Val-Ala-Tyr-Pro-Ala-Leu-Glu
 und
 Ser-Gln-Leu-Glu-Thr-Pro-Glu-Thr-Leu-Leu-Gly-Ser-Thr-Glu-Glu-Lys-Pro-Leu
 und
 Val-Phe-Cys-Thr
 und

Asn-Gln-Pro-Gln-Ala-Pro-Gly-Val-Glu-Ala-Ser-Gly-Ala-Gly-Glu-Ala
und
Leu-Cys-Ala-Pro
und

5 Val-Pro-His-Leu-Pro-Ala-Asp
und

Gly-Ser-Gln-Gly-Pro-Glu-Gln-Gln-X-X-Leu-Ile-X-Ala-Pro

wobei X für einen Aminosäurerest steht, der nicht bestimmt werden konnte.

10

Beispiel 8

15 Bestimmung von Basensequenzen von komplementärer DNA (cDNA)

Ausgehend von der Aminosäuresequenz gemäss Formel IA wurden unter Berücksichtigung des genetischen Codes zu den Aminosäureresten 2-7 und 17-23 entsprechende, vollständig degenerierte Oligonucleotide in geeigneter Komplementarität synthetisiert ("sense" and "antisense" Oligonucleotide).
20 Totale zelluläre RNA wurde aus HL60-Zellen isoliert [42, 43], und der erste cDNA-Strang durch Oligo-dT-Priming oder durch Priming mit dem "antisense" Oligonucleotid mittels eines cDNA-Synthese-Kits (RPN 1256, Amersham, Amersham, England) gemäss der Anleitung des Herstellers synthetisiert. Dieser cDNA-Strang und die beiden synthetisierten degenerierten "sense" und "anti-sense" Oligonucleotide wurden in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA gemäss Anleitung des
25 Herstellers) dazu verwendet, die für die Aminosäure-Reste 8-16 (Formel IA) codierende Basensequenz als cDNA-Fragment zu synthetisieren. Die Basensequenz dieses cDNA-Fragmentes lautet: 5'-AGGGAGAAGAGAGATAGTGTGTGTCCC-3'. Dieses cDNA-Fragment wurde als Probe verwendet, um nach bekannten Verfahren einen für das 55 kD TNF-BP codierenden cDNA-Klon in einer λ gt11-cDNA-Genbank von menschlicher Placenta zu identifizieren (42,43). Dieser Klon wurde dann nach üblichen Methoden aus
30 dem λ -Vektor geschnitten und in die Plasmide pUC18 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) und pUC19 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) und in die M13mp18/M13mp19 Bacteriophagen (Pharmacia, Uppsala, Sweden) kloniert (42,43). Die Nukleotidsequenz dieses cDNA-Klons wurde mit einem Sequenase-Kit (U.S. Biochemical, Cleveland, Ohio, USA) nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Die Nukleotidsequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz für das 55 kD TNF-BP und dessen Signalpeptid
35 (Aminosäure "-28" bis Aminosäure "0") ist in Figur 1 mittels der im Stand der Technik üblichen Abkürzungen für Basen wie Aminosäuren dargestellt. Aus Sequenzvergleichen mit anderen, bereits bekannten Rezeptorproteinsequenzen lassen sich ungefähr 180 Aminosäuren enthaltende N-terminale wie 220 Aminosäure enthaltende C-terminale Domänen, die von einer nach den Sequenzvergleichen typischen Transmembran-Region von 19 Aminosäuren (in Figur 1 unterstrichen) getrennt werden, bestimmen. Hypo-
40 thetische Glykosylierungsstellen sind in Figur 1 durch Sterne über der entsprechenden Aminosäure gekennzeichnet.

Im Wesentlichen analoge Techniken wurden dazu eingesetzt, 75/65 kD TNF-BP codierende Partielle cDNA-Sequenzen zu identifizieren, wobei allerdings in diesem Fall genomische humane DNA und von Peptid IIA abgeleiteten vollständig degenerierte 14-mere und 15-mere "sense" und "antisense" Oligonucleotide verwendet wurden, um eine primäre, 26 bp cDNA-Probe in einer Polymerase-Kettenreaktion
45 herzustellen. Diese cDNA-Probe wurde dann dazu verwendet in einer HL-60 cDNA-Bibliothek cDNA-Klone von verschiedener Länge zu identifizieren. Diese cDNA-Bibliothek wurde mittels isolierter HL60 RNA und einem cDNA-Klonierungskit (Amersham) nach den Angaben des Herstellers hergestellt. Die Sequenz eines solchen cDNA-Klons ist in Figur 4 dargestellt, wobei nochmalige Sequenzierung zu folgender Korrektur
50 führte. An Stelle des Serins in Position 3 muss ein Threonin das von "ACC" nicht von "TCC" kodiert wird, stehen.

Beispiel 9

55

Expression in COS 1-Zellen

Für die Expression in COS-Zellen wurden Vektoren ausgehend von dem Plasmid "pN11" konstruiert. Das Plasmid "PN11" enthält den effizienten Promotor und Enhancer des "major immediate-early" Gens des menschlichen Cytomegalovirus ("HCMV"; Boshart et al., Cell 41, 521-530, 1985). Hinter dem Promotor befindet sich eine kurze DNA-Sequenz, welche mehrere Restriktionsschnittstellen enthält, die nur einmal im Plasmid vorkommen ("Polylinker"), u.a. die Schnittstellen für HindIII, Ball, BamHI und PvuII (siehe Sequenz).

PvuII

5' - AAGCTTGGCCAGGATCCAGCTGACTGACTGATCGCGAGATC - 3'
3' - TTCGAACCGGTCCTAGGTGCGACTGACTGACTAGCGCTCTAG - 5'

Hinter diesen Schnittstellen befinden sich drei Translations-Stopcodons in allen drei Leserastern. Hinter der Polylinkersequenz befindet sich das 2. Intron und das Polyadenylierungssignal des Präproinsulins der Ratte (Lomedico et al., Cell 18, 545-558, 1979). Das Plasmid enthält ferner den Replikationsursprung des SV40 Virus sowie ein Fragment aus pBR322, das E. coli-Bakterien Ampicillin-Resistenz verleiht und die Replikation des Plasmids in E. coli ermöglicht.

Zur Konstruktion des Expressionsvektors "pN123" wurde dieses Plasmid "pN11" mit der Restriktions-
endonuklease PvuII geschnitten und anschliessend mit alkalischer Phosphatase behandelt. Der dephosphorylierte Vektor wurde danach aus einem Agarosegel isoliert (V1). Die 5'-überhängenden Nukleotide des EcoRI-geschnittenen 1,3kb-Fragments der 55 kD TNF-BP-cDNA (siehe Beispiel 8) wurden mit Hilfe von Klenow-Enzym aufgefüllt. Anschliessend wurde dieses Fragment aus einem Agarosegel isoliert (F1). Danach wurden V1 und F1 mittels T4-Ligase miteinander verbunden. E. coli HB101-Zellen wurden dann mit diesem Ligierungsansatz nach bekannten Methoden [42] transformiert. Mit Hilfe von Restriktionsanalysen und DNA-Sequenzierung nach bekannten Methoden [42] wurden Transformanten identifiziert, die mit einem Plasmid transformiert worden waren, welches das 1,3kb EcoRI-Fragment der 55 kD TNF-BP-cDNA in der für die Expression über den HCMV-Promotor korrekten Orientierung enthielt. Dieser Vektor erhielt die Bezeichnung "pN123".

Zur Konstruktion des Vektors "pK19" wurde folgendermassen verfahren. Ein DNA-Fragment, welches nur die für den extrazellulären Teil des 55 kD TNF-BP codierende cDNA enthält (Aminosäuren -28 bis 182 gemäss Figur 1) wurde mittels PCR-Technologie erhalten (Said et al., Science 230, 1350-1354, 1985, siehe auch Beispiel 8). Die folgenden Oligonukleotide wurden, um die für den extrazellulären Teil des 55 kD TNF-BP codierende cDNA aus "pN123" zu amplifizieren, verwendet:

BamHI

5' - CACAGGGATCCATAGCTGTCTGGCATGGGCTCTCCAC - 3'

ASP718

3' - CGTGACTCCTGAGTCCGTGGTGTATTATCTCTAGACCATGGCCC - 5'

Durch diese Oligonukleotide wurden ebenfalls zwei Stopkodons der Translation hinter Aminosäure 182 eingeführt. Das so amplifizierte DNA-Fragment wurde mit BamHI und Asp718 geschnittene die hierbei entstandenen überstehenden Enden mit Hilfe des Klenow-Enzyms aufgefüllt und dieses Fragment anschliessend aus einem Agarosegel isoliert (F2). F2 wurde dann mit V1 ligiert und der gesamte Ansatz zur Transformation von E. coli HB101, wie bereits beschriebene verwendet. Transformanten, die mit einem Plasmid transformiert worden waren, welches das DNA-Fragment in der für die Expression über den HCMV-Promotor korrekten Orientierung enthielten, wurden mittels DNA-Sequenzierung (s.o.) identifiziert. Das daraus isolierte Plasmid erhielt die Bezeichnung "pK19".

Transfektion der COS-Zellen mit den Plasmiden "pN123" oder "pK19" wurde nach der von Feigner et al. veröffentlichten Lipofektions-Methode (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417, 1987) durchgeführt. 72 Stunden nach erfolgter Transfektion wurden die mit "pN123" transfizierten Zellen nach bekannten Methoden mit ¹²⁵I-TNFα auf Bindung analysiert. Das Resultat der Scatchard-Analyse [Scatchard, G., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660, 1949] der so erhaltenen Bindungsdaten (Figur 2A) ist in Figur 2B dargestellt. Die Kulturüberstände der mit "pK19" transfizierten Zellen wurden in einem "Sandwich"-Test untersucht. Dazu wurden PVC-Microtiterplatten (Dynatech, Arlington, VA, USA) mit 100 µl/Loch eines Kaninchen-anti-Maus

Immunglobulins (10 µg/ml PBS) sensibilisiert. Anschliessend wurde die Platte gewaschen und mit einem anti-55 kD TNF-BP-Antikörper, der gemäss Beispiel 3 durch seine Antigenbindung nachgewiesen und isoliert wurde, der aber die TNF-Bindung an Zellen nicht inhibiert, inkubiert (3 Stunden, 20 °C). Die Platte wurde dann wieder gewaschen und über Nacht bei 4 °C mit 100 µl/Loch der Kulturüberstände (1:4 verdünnt mit 1% entfetteter Milchpulver enthaltendem Puffer A: 50 mM Tris/HCl pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,02% Na-Azid) inkubiert. Die Platte wurde entleert und mit ¹²⁵I-TNFα enthaltendem Puffer A (10⁵ cpm/ml, 100 µl/Loch) mit oder ohne Zusatz von 2 µg/ml unmarkiertem TNF während 2 Stunden bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Platte 4 mal mit PBS gewaschen, die einzelnen Löcher wurden ausgeschnitten und in einem γ-Zähler gemessen. Die Resultate von 5 parallelen Transfektionen (Säulen # 2, 3, 4, 6 und 7), von zwei Kontroll-Transfektionen mit dem pN11-Vektor (Säulen # 1, 5) und von einer Kontrolle mit HL60-Zell-Lysat (Säule # 8) sind in Figur 3 dargestellt.

Beispiel 10

Expression in Insektenzellen

Für die Expression in einem Baculovirus-Expressionssystem wurde von dem Plasmid "pVL941" (Luckow und Summers, 1989, "High Level Expression of Nonfused Foreign Genes with Autographa californica Nuclear Polyhedrosis virus Expression Vectors", Virology 170, 31-39) ausgegangen und dieses folgendermassen modifiziert. Es wurde die einzige EcoRI-Restriktionsschnittstelle in "pVL941" entfernt, indem das Plasmid mit EcoRI geschnitten und die überstehenden 5'-Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt wurden. Das hieraus erhaltene Plasmid pVL941/E- wurde mit BamHI und Asp718 verdaut und der Vektorrumpf anschliessend aus einem Agarosegel isoliert. Dieses Fragment wurde mit einem synthetischen Oligonukleotid der folgenden Sequenz ligiert:

```

          BamHI   EcoRI           Asp718
30      5' - GATCCGAGAATTCATAATTAG - 3'
          3' -      GTCTTAAGTATTATCCATG - 5'

```

E. coli HB101 wurde mit dem Ligierungsansatz transformiert und Transformanten, die ein Plasmid enthielten, in welches das Oligonukleotid korrekt eingebaut worden war, wurden durch Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung nach bekannten Methoden (s.o.) identifiziert; dieses Plasmid wurde "PNR704" genannt. Zur Konstruktion des Transfervektors "pN113" wurde dieses Plasmid "pNR704" mit EcoRI geschnitten, mit alkalischer Phosphatase behandelt und der so erzeugte Vektorrumpf (V2) anschliessend aus einem Agarosegel isoliert. Das wie oben mit EcoRI geschnittene 1,3 kb-Fragment der 55 kD TNF-BP-cDNA wurde mit Fragment V2 ligiert. Mit diesem Ligierungsansatz erhaltene Transformanten, die ein Plasmid enthielten, welches das cDNA-Insert in der korrekten Orientierung für die Expression über den Polyhedrinpromotor enthielten, wurden identifiziert (s.o.). Der daraus isolierte Vektor erhielt die Bezeichnung "PN113".

Zur Konstruktion des Transfervektors "pN119" wurde folgendermassen vorgegangen. Das 1,3 kb EcoRI/EcoRI-Fragment der 55 kD TNF-BP cDNA in dem "pUC19"-Plasmid (siehe Beispiel 8) wurde mit BstI verdaut und mit dem folgenden synthetischen Oligonukleotid ligiert:

```

          BstI           Asp718
50      5' - GCACCACATAATAGAGATCTGGTACCGGGAA - 3'
          3' -      GTGTATTATCTCTAGACCATGGCCC - 5'

```

Mit dem obigen Adaptor werden zwei Stopcodons der Translation hinter Aminosäure 182 und eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease Asp718 eingebaut. Nach erfolgter Ligation wurde der Ansatz mit EcoRI und Asp718 verdaut und das partielle 55 kD TNF-BP-Fragment (F3) isoliert. Weiterhin wurde das ebenfalls mit Asp718 und EcoRI geschnittene Plasmid "pNR704" mit F3 ligiert und der Ligierungsansatz in E. coli HB101 transformiert. Die Identifikation der Transformanten, welche ein Plasmid enthielten, in das die

partielle 55 kD TNF-BP cDNA korrekt für die Expression integriert worden war, erfolgte wie bereits beschrieben. Das aus diesen Transformanten isolierte Plasmid erhielt den Namen "pN119".

Zur Konstruktion des Transfervektors "pN124" wurde folgendermassen vorgegangen. Das in Beispiel 9 beschriebene, für den extrazellulären Teil des 55 kD TNF-BP codierende cDNA-Fragment wurde mit den angegebenen Oligonukleotiden mit Hilfe der PCR-Technologie, wie in Beispiel 9 beschriebene amplifiziert. Dieses Fragment wurde mit BamHI und Asp718 geschnitten und aus einem Agarosegel isoliert (F4). Das Plasmid "pNR704" wurde ebenfalls mit BamHI und Asp718 geschnitten und der Vektorrumpf (V4) wurde isoliert (s.o.). Die Fragmente V4 und F4 wurden ligiert, E. coli HB101 damit transformiert und der rekombinante Transfervektor "pN124" wurde, wie beschrieben, identifiziert und isoliert.

Zur Transfektion der Insektenzellen wurde folgendermassen vorgegangen. 3 µg des Transfervektors "pN113" wurden mit 1 µg DNA des Autographa californica-Nukleär-polyhedrovirus (AcMNPV) (EP 127839) in Sf9-Zellen (ATCC CRL 1711) transfiziert. Polyhedrin negative Viren wurden identifiziert und aus "Plaques" gereinigt [52]. Mit diesen rekombinanten Viren wurden wiederum Sf9 Zellen wie in [52] beschriebene infiziert. Nach 3 Tagen in Kultur wurden die infizierten Zellen auf Bindung von TNF mittels ^{125}I -TNF α untersucht. Dazu wurden die transfizierten Zellen mit einer Pasteurpipette von der Zellkulturschale abgewaschen und bei einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml Kulturmedium [52], das 10 ng/ml ^{125}I -TNF- α enthielt, sowohl in Anwesenheit wie Abwesenheit von 5 µg/ml nichtmarkiertem TNF- α resuspendiert und 2 Stunden auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mit reinem Kulturmedium gewaschen und die zellgebundene Radioaktivität in einem γ -Zähler gezählt (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2

Zellen	Zellgebundene Radioaktivität pro 10^6 Zellen
nichtinfizierte Zellen (Kontrolle)	60 cpm
infizierte Zellen	1600 ± 330 cpm ¹⁾

¹⁾ Mittelwert und Standardabweichung aus 4 Experimenten

Beispiel 11

Analog zu dem in Beispiel 9 beschriebenen Verfahren wurde das für den extrazellulären Bereich des 55 kDa TNF-BP codierende cDNA-Fragment, nun jedoch mit den folgenden Oligonukleotiden als Primer, in einer Polymerasen-Kettenreaktion amplifiziert:

Oligonukleotid 1:

Sst I

5'-TAC GAG CTC GGC CAT AGC TGT CTG GCA TG-3'

Oligonukleotid 2:

Sst I

5'-ATA GAG CTC TGT GGT GCC TGA GTC CTC AG-3'

Dieses cDNA-Fragment wurde in den pCD4-H₃-Vektor [DSM 5523; Europäische Patentanmeldung Nr.

90107393.2; Japanische Patentanmeldung Nr. 108967/90; US Patent Application Ser.No. 510773/90] ligiert, aus dem die CD4-cDNA über die Sst I-Restriktions-Schnittstellen herausgenommen worden war. SstI-Schnittstellen befinden sich in dem Vektor pCD4-Hy3 sowohl vor wie in dem CD4-Teilsequenzstück wie dahinter. Das Konstrukt wurde mittels Protoplastenfusion nach Oi et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 , 825-829, 1983) in J558-Myelomzellen (ATCC Nr. TIB6) transfiziert. Transfektanten wurden durch Zugabe von 5 µg/ml Mycophenolsäure und 250 µg/ml Xanthin (Traunecker et al., Eur. J. Immunol. 16 , 851-854 [1986]) in das Grundmedium (Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium, 10% fötales Kälberserum, 5 x 10⁻⁵ M 2-Mercaptoethanol) selektioniert. Das von den transfizierten Zellen sekretierte Expressionsprodukt konnte mittels üblicher Methoden der Proteinchemie, z.B. TNF-BP-Antikörper-Affinitätschromatographie, gereinigt werden. Falls nicht bereits spezifisch angegeben, wurden zur Kultivierung der verwendeten Zelllinien, zum Klonieren, Selektionieren bzw. zur Expansion der klonierten Zellen Standardverfahren, wie z.B. von Freshney, R.I. in "Culture of Animal Cells", Alan R. Liss, Inc., New York (1983) beschrieben, verwendet.

15

Literatur

1. G.E. Nedwin, S.L. Naylor, A.Y. Sakaguchi, D. Smith, J. Jarrett-Nedwin, D. Pennica, D.V. Goeddel and P.W. Gray: Nucl. Acids Res. 13 , 6361, 1985
2. B. Beutler and A. Cerami: New England J. Med. 316 , 379, 1987
3. L.J. Old: Science 230 , 630, 1985
4. G. Trinchieri, M. Kobayashi, M. Rosen, R. Loudon, M. Murphy and B. Perussia: J. exp. Med. 164 , 1206, 1986
5. J. Vilcek, V.J. Palombella, D. Henriksen-de Stefano, C. Swenson, R. Feinman, M. Hirai and M. Tsujimoto: J. exp. Med. 163 , 632, 1986
6. B.J. Sugarman, B.B. Aggarwal, P.E. Hass, I.S. Figari, M.A. Palladino and H.M. Shepard: Science 230 , 943, 1985
7. J.R. Gamble, J.M. Harlan, S.J. Klebanoff and M.A. Vadas: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 , 8667, 1985
8. N. Sato, T. Goto, K. Haranaka, N. Satomi, H. Nariuchi, Y. Mano and Y. Sawasaki: J. Natl. Cancer Inst. 76 , 1113, 1986
9. A.H. Stolpen, E.C. Guinan, W. Fiers and J.S. Pober: Ann. N.Y. Acad. Sci. 486 , 16, 1986
10. J.S. Pober, L.A. Lippman, A.H. Stolpen, T.A. Brock, T.A. Springer, W. Fiers, M.P. Bevilacqua, D.L. Mendrick and M.A. Gimbrone: J. Immunol. 138 , 3319, 1987
11. M. Kawakami, P. Pekala, M. Lane and A. Cerami: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 , 912, 1982
12. T. Collins, L.A. Lippman, W. Fiers, J.L. Strominger and J.S. Pober: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 , 446, 1986
13. G.H.W. Wong and D.V. Goeddel: Nature 323 , 819, 1986
14. J.W. Lowenthal, D.W. Ballard, E. Böhlein and W.C. Greene: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 , 2331, 1989
15. M.J. Lenardo, C.M. Fan, T. Maniatis and D. Baltimore: Cell 57 , 287, 1989
16. A.E. Goldfeld and T. Maniatis: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 , 1490, 1989
17. A. Waage, A. Halstensen and T. Espevik: Lancet, Febr. 14, 1987, 355.
18. C.O. Jacob and H.O. McDavitt: Nature 331 , 356, 1988
19. G.E. Grau, L.F. Fajardo, P. Piguet, B. Allet, P. Lambert and P. Vassalli: Science 237 , 1210, 1987
20. B. Beutler, I.W. Milsark and A.C. Cerami: Science 229 869, 1985
21. B.B. Aggarwal, T.E. Eessalu and P.E. Hass: Nature 318 , 665, 1985
22. M. Tsujimoto, Y.K. Yip and J. Vilcek: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 , 7626, 1985
23. C. Baglioni, S. McCandless, J. Tavernier and W. Fiers: J. Biol. Chem. 260 , 13395, 1985
24. P. Hohmann, R. Remy, M. Brockhaus and A.P.G.M. van Loon: J. Biol. Chem., im Druck
25. F.C. Kull, S. Jacobs and P. Cuatrecasas: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 , 5758, 1985
26. A.A. Creasy, R. Yamamoto and Ch.R. Vitt: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 , 3293, 1987
27. G.B. Stauber, R.A. Ayer and B.B. Aggarwal: J. Biol. Chem. 263 , 19098, 1988
28. K. Hirano, K. Yamamoto, Y. Kobayashi and T. Osawa: J. Biochem. 105 , 120, 1989
29. Y. Niitsu, N. Watanabe, H. Sone, H. Neda, N. Yamauchi, M. Maeda and I. Urushizaki: J. Biol. Resp. Modifiers 7 , 276, 1988
30. I. Olsson, A. Grubb, U. Gullberg, M. Lantz, E. Nilsson, C. Pestre and H. Thysell: Abstract, 2nd Intern. Conference on Tumor Necrosis Factor and Related Cytokines, Napa, California, 15.-20. Januar 1989
31. H.R. Löttscher and M. Brockhaus: Abstract, 2nd Intern. Conference on Tumor Necrosis Factor and

Related Cytokines, Napa, California, 15.-20. Januar 1989

32. M. Brockhaus, H. Lötscher, H.-P. Hohmann und W. Hunziker: Abstract, 2nd Intern. Conference on Tumor Necrosis Factor and Related Cytokines, Napa, California, 15.-20. Januar 1989
33. C.R. Cantor and P.R. Schimmel, in Biophysical Chemistry, W.H. Freeman, ed., San Francisco, 1980, p. 850
34. M.W. Hunkapiller, E. Lujan, F. Ostrander, L.E. Hood: Methods Enzymol. 91, 227, 1983
35. U.K. Lammli: Nature 227, 680, 1970
36. T.St. John, W.M. Gallatin, M. Siegelman, H.T. Smith, V.A. Fried and I.L. Weissman: Science 231, 845, 1986
37. M. Siegelman, M.W. Bond, W.M. Gallatin, T.St. John, H.T. Smith, V.A. Fried and I.L. Weissman: Science 231, 823, 1986
38. H. Towbin, T. Staehelin and J. Gordon: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350, 1979
39. Dinarello, Ch.A., in Lymphokines, Vol. 14, E. Pick, ed., p. 1, Academic Press, London, 1987
40. D.J. Merchant, R.H. Kahn and W.H. Murphy: Handbook of Cell and Organ Culture, Burgess Publ. Co., Minneapolis, 1969
41. G.E. Grau, T.E. Taylor, M.E. Molyneux, J.J. Wirima, P. Vassalli, M. Hommel and P. Lambert: New Engl. J. Med. 320, 1586, 1989
42. J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
43. F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.A. Smith, J.G. Seidman and K. Struhl: Current Protocols in Molecular Biology 1987-1988, S. Wiley and Sons, New York, 1987
44. E. Harlow and D. Lane: Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Publications, New York, 1988
45. S.Fazekas de St. Groth and D. Scheidegger: J. Immunol. Methods 35, 1, 1980
46. D. Pennica and D.V. Goeddel, in Lymphokines, Vol. 13, D.R. Webb and D.V. Goeddel, eds. p. 163, Academic Press, London, 1987
47. J. Tavernier, L. Franzen, A. Marmenout, J. van der Heyden, R. Muller, M. Ruyschaert, A. van Vliet, R. Banden and W. Fiers, in Lymphokines, Vol. 13, D.R. Webb and D.V. Goeddel, eds., p. 181, Academic Press, London
48. P.J. Fraker and J.C. Speck: Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 849, 1987
49. D.H. Erlich, D.H. Gelfand, R.K. Saiki: Nature 331, 61, 1988
50. Bosserhoff, J. Wallach and R.W. Frank: J. Chromatogr. 473, 71, 1989
51. R. Lathe: J. Mol. Biol. 183, 1, 1985
52. Luckow and Summers, "A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures", Texas Agricultural Experimental Station, Texas A & M University, Bulletin Nr. 1555, 2nd edition, 1988

Ansprüche

1. Nichtlösliche Proteine und lösliche oder nichtlösliche Fragmente davon, die TNF binden, in homogener Form, sowie deren physiologisch verträgliche Salze.
2. Verbindungen gemäss Anspruch 1, die durch Molekulargewichte gemäss SDS-PAGE unter nichtreduzierenden Bedingungen von etwa 55 kD und 75 kD charakterisiert sind.
3. Verbindungen gemäss einem der Ansprüche 1 und 2, die wenigstens eine der folgenden Aminosäuresequenzen enthalten:
Leu-Val-Pro-His-Leu-Gly-Asp-Arg-Glu-Lys-Arg-Asp-Ser-Val-Cys-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-X-Asn-Ser-Ile;
Ser-Thr-pro-Glu-Lys-Glu-Gly-Glu-Leu-Glu-Gly-Thr-Thr-Thr-Lys;
Leu-Pro-Ala-Gln-Val-Ala-Phe-X-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr-Cys;
Ile-X-Pro-Gly-Phe-Gly-Val-Ala-Tyr-Pro-Ala-Leu-Glu;
Ser-Gln-Leu-Glu-Thr-Pro-Glu-Thr-Leu-Leu-Gly-Ser-Thr-Glu-Glu-Lys-Pro-Leu;
Val-Phe-Cys-Thr;
Asn-Gln-Pro-Gln-Ala-Pro-Gly-Val-Glu-Ala-Ser-Gly-Ala-Gly-Glu-Ala;
Leu-Cys-Ala-Pro;
Val-Pro-His-Leu-Pro-Ala-Asp;
Gly-Ser-Gln-Gly-Pro-Glu-Gln-Gln-X-X-Leu-Ile-X-Ala-Pro
wobei X für einen nicht bestimmten Aminosäurerest steht.

4. DNA-Sequenzen, die für nichtlösliche Proteine oder lösliche wie nichtlösliche Fragmente davon, die TNF binden, kodieren, wobei solche DNA-Sequenzen aus den folgenden auswählbar sind:
 - (a) DNA-Sequenzen, wie sie in Figur 1 oder Figur 4 dargestellt sind, wie deren komplementären Stränge, oder solche, die diese Sequenzen umfassen;
 - 5 (b) DNA-Sequenzen, die mit wie unter (a) definierten Sequenzen oder Fragmenten davon hybridisieren;
 - (c) DNA-Sequenzen, die auf Grund der Entartung des genetischen Codes nicht mit Sequenzen, wie unter (a) und (b) definierte hybridisieren, aber die für Polypeptide mit genau gleicher Aminosäuresequenz kodieren.
5. DNA-Sequenzen gemäss Anspruch 4, die eine Kombination aus zwei Teil-DNA-Sequenzen umfassen,
 - 10 wobei die eine Teilsequenz für lösliche Fragmente von nichtlöslichen Proteinen, die TNF binden kodiert und die andere Teil-Sequenz, für alle Domänen ausser der ersten Domäne der konstanten Region der schweren Kette von humanen Immunglobulinen, wie IgG, IgA, IgM bzw. IgE, kodiert.
6. DNA-Sequenzen gemäss Anspruch 5, wobei besagte humane Immunglobuline IgM bzw. solche der Klasse IgG sind.
- 15 7. DNA-Sequenzen gemäss Anspruch 6, wobei besagte humane Immunglobuline solche vom Typ IgI bzw. Ig3 sind.
8. Von DNA-Sequenzen gemäss einem der Ansprüche 4-7 kodierte rekombinante Proteine, wie allelische Varianten, oder Deletions-, Substitutions- oder Additionsanaloge davon.
9. Vektoren, die DNA-Sequenzen gemäss einem der Ansprüche 4-7 enthalten und zur Expression der von
 - 20 diesen DNA-Sequenzen kodierten Proteinen in prokaryotischen- wie eukaryotischen Wirtssystemen geeignet sind.
10. Prokaryotische- wie eukaryotische Wirtssystemen die mit einem Vektor gemäss Anspruch 9 transformiert worden sind.
11. Wirtssysteme gemäss Anspruch 10, wobei diese Säuger- oder Insektenzellen sind.
- 25 12. Gegen eine Verbindung gemäss einem der Ansprüche 1-3 oder 8 gerichtete Antikörper.
13. Ein Verfahren zur Isolierung einer Verbindung gemäss einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, dass man im wesentlichen die folgenden Reinigungsschritte nacheinander ausführt: Herstellung eines Zellextraktes, Immunaффinitätschromatographie und/oder ein- oder mehrfache Ligandaффinitätschromatographie, HPLC und präparative SDS-PAGE und falls gewünschte die so isolierten Verbindungen chemisch oder
 - 30 enzymatisch spaltet und/oder in geeignete Salze überführt.
14. Ein Verfahren zur Herstellung einer Verbindung gemäss Anspruch 8, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man ein wie in Anspruch 10 oder 11 beanspruchtes transformiertes Wirtssystem in einem geeigneten Medium kultiviert und aus dem Wirtssystem selbst oder dem Medium solche Verbindungen isoliert.
15. Pharmazeutische Präparate, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine oder mehrere Verbindung(en)
 - 35 gemäss einem der Ansprüche 1-3 oder 8, gewünschtenfalls in Kombination mit weiteren pharmazeutisch wirksamen Substanzen und/oder nicht-toxischen, inerten, therapeutisch verträglichen Trägermaterialien enthalten.
16. Pharmazeutische Präparate zur Behandlung von Krankheiten, bei denen TNF Involviert ist, wobei solche Präparate dadurch gekennzeichnet sind, dass sie eine oder mehrere Verbindung(en) gemäss einem der
 - 40 Ansprüche 1-3 oder 8, gewünschtenfalls in Kombination mit weiteren Pharmazeutisch wirksamen Substanzen und/oder nicht-toxischen, inerten, therapeutisch verträglichen Trägermaterialien enthalten.
17. Verwendung einer Verbindung gemäss einem der Ansprüche 1-3 oder 8 zur Behandlung von Krankheiten.
18. Verwendung einer Verbindung gemäss einem der Ansprüche 1-3 oder 8 zur Behandlung von Krankheiten, bei denen TNF involviert ist.
- 45 19. Eine wie in einem der Ansprüche 1-3 oder 8 beanspruchte Verbindung wann immer sie nach einem wie in Anspruch 13 oder 14 beanspruchten Verfahren hergestellt worden ist.

50

55

Figur 1

-185 GAATTCGGGGGGGTTCAAGATCACTGGGACCAGGCCGTGATCTCTATGCCCCGAGTCTCAA
 -125 CCCTCAACTGTCACCCCAAGGCACTTGGGACGTCTTGGACAGACCGAGTCCCGGGAAGCC
 -65 CCAGCACTGCCGCTGCCCACTGCCCTGAGCCCCAATGGGGGAGTGAGAGGCCATAGCTG
 -28.
 -30 MetGlyLeuSerThrValProAspLeuLeuLeuProLeuValLeuLeuGluLeu
 -5 TCTGGCATGGGCCTCTCCACCGTGCCTGACCTGCTGCTGCCGCTGGTGCTCCTGGAGCTG
 +1
 -10 LeuValGlyIleTyrProSerGlyValIleGlyLeuValProHisLeuGlyAspArgGlu
 55 TTGGTGGGAATATACCCCTCAGGGGTATTGGACTGGTCCCTCACCTAGGGGACAGGGAG

 10 LysArgAspSerValCysProGlnGlyLysTyrIleHisProGlnAsnAsnSerIleCys
 115 AAGAGAGATAGTGTGTGTCCCAAGGAAATATATCCACCTCAAATAATTTCGATTTC
 30 CysThrLysCysHisLysGlyThrTyrLeuTyrAsnAspCysProGlyProGlyGlnAsp
 175 TGTACCAAGTGCCACAAAGGAACCTACTTGTACAATGACTGTCCAGGCCCGGGCCAGGAT
 50 ThrAspCysArgGluCysGluSerGlySerPheThrAlaSerGluAsnHisLeuArgHis
 235 ACGGACTGCAGGGAGTGTGAGAGCGGCTCCTTCACCGCTTCAGAAACACCTCAGACAC
 70 CysLeuSerCysSerLysCysArgLysGluMetGlyGlnValGluIleSerSerCysThr
 295 TGCCTCAGCTGCTCCAAATGCCGAAAGGAAATGGGTGAGTGGAGATCTCTTCTGCACA
 90 ValAspArgAspThrValCysGlyCysArgLysAsnGlnTyrArgHisTyrTrpSerGlu
 355 GTGGACCGGGACACCGTGTGTGGCTGCAGGAAGAACCAGTACCGGCATTATTGGAGTGAA

 110 AsnLeuPheGlnCysPheAsnCysSerLeuCysLeuAsnGlyThrValHisLeuSerCys
 415 AACCTTTTCAGTGCTTCAATTGCAGCCTCTGCCTCAATGGGACCGTGCACCTCTCTCGC
 130 GlnGluLysGlnAsnThrValCysThrCysHisAlaGlyPhePheLeuArgGluAsnGlu
 475 CAGGAGAAACAGAACACCGTGTGCACCTGCCATGCAGGTTCTTTCTAAGAGAAAACCG
 150 CysValSerCysSerAsnCysLysLysSerLeuGluCysThrLysLeuCysLeuProGln
 535 TGTGTCTCCTGTAGTAAGTGTAAAGAAAGCCTGGAGTGCACGAAGTTGTGCCTACCCAG
 170 IleGluAsnValLysGlyThrGluAspSerGlyThrThrValLeuLeuProLeuValIle
 595 ATTGAGAATGTTAAGGGCACTGAGGACTCAGGCACCACAGTGTGTTGCCCTGGTCATT
 190 PhePheGlyLeuCysLeuLeuSerLeuLeuPheIleGlyLeuMetTyrArgTyrGlnArg
 655 TTCTTTGGTCTTTGCCCTTTATCCCTCCTCTTCATTGGTTTAATGTATCGCTACCAACGG
 210 TrpLysSerLysLeuTyrSerIleValCysGlyLysSerThrProGluLysGluGlyGlu
 715 TGAAGTCCAAGCTCTACTCCATTGTTTGTGGGAAATCCACACCTGAAAAAGAGGGGGAG

 230 LeuGluGlyThrThrThrLysProLeuAlaProAsnProSerPheSerProThrProGly
 775 CTGAGGAAGTACTACTAAGCCCTGGCCCCAAACCCAGCTTCAGTCCCACTCCAGGC
 250 PheThrProThrLeuGlyPheSerProValProSerSerThrPheThrSerSerSerThr
 -835 TTCACCCCAACCTGGGCTTCAGTCCCGTGGCCAGTTCACCTTCACCTCCAGCTCCACC
 270 TyrThrProGlyAspCysProAsnPheAlaAlaProArgArgGluValAlaProProTyr
 895 TATACCCCGGTGACTGTCCCACTTTGCGGCTCCCGCAGAGAGGTGGCACCACCCAT
 290 GlnGlyAlaAspProIleLeuAlaThrAlaLeuAlaSerAspProIleProAsnProLeu
 955 CAGGGGGCTGACCCCATCCTTGGCAGCCCTCGCCTCCGACCCCATCCCCAACCCCTT

Figur 1 (Forts.)

310 GlnLysTrpGluAspSerAlaHisLysProGlnSerLeuAspThrAspAspProAlaThr
 1015 CAGAAGTGGGAGGACAGCGCCCAAGCCACAGAGCCTAGACACTGATGACCCCGCGACG

 330 LeuTyrAlaValValGluAsnValProProLeuArgTrpLysGluPheValArgArgLeu
 1075 CTGTACGCCGTGGTGGAGAACGTGCCCCCGTTGCGCTGGAAGGAATTCGTGCGGCGCCTA

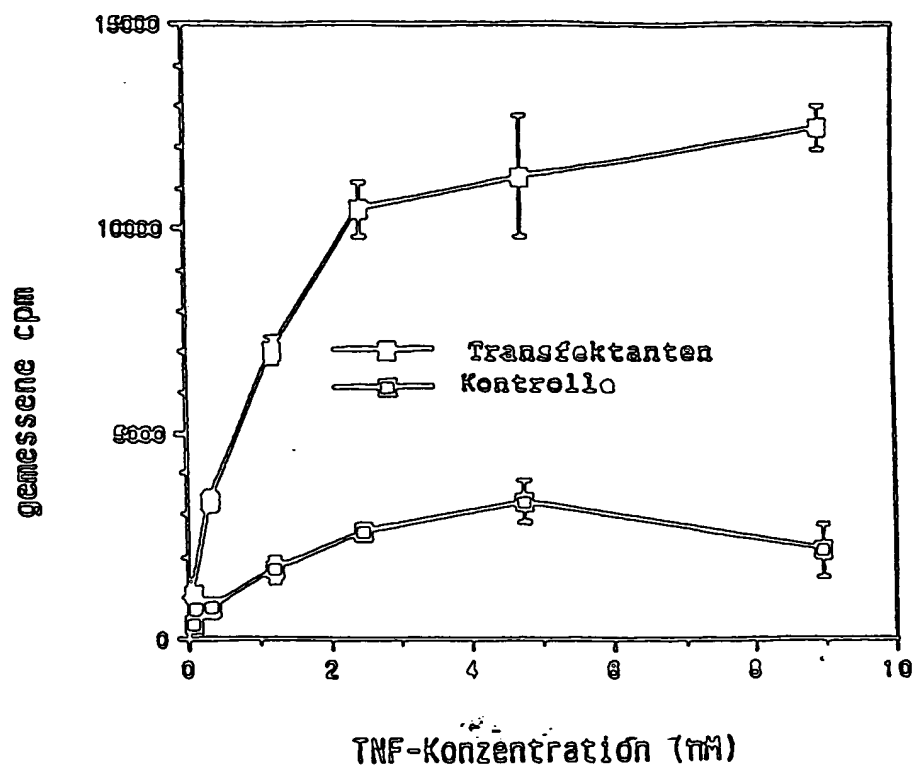
 350 GlyLeuSerAspHisGluIleAspArgLeuGluLeuGlnAsnGlyArgCysLeuArgGlu
 1135 GGGCTGAGCGACACGAGATCGATCGGCTGGAGCTGCAGAACGGGCGCTGCCTGCGCGAG

 370 AlaGlnTyrSerMetLeuAlaThrTrpArgArgArgThrProArgArgGluAlaThrLeu
 1195 GCGCAATACAGCATGCTGGCGACCTGGAGGCGGCGCACGCCGCGGCGCGAGGCCACGCTG

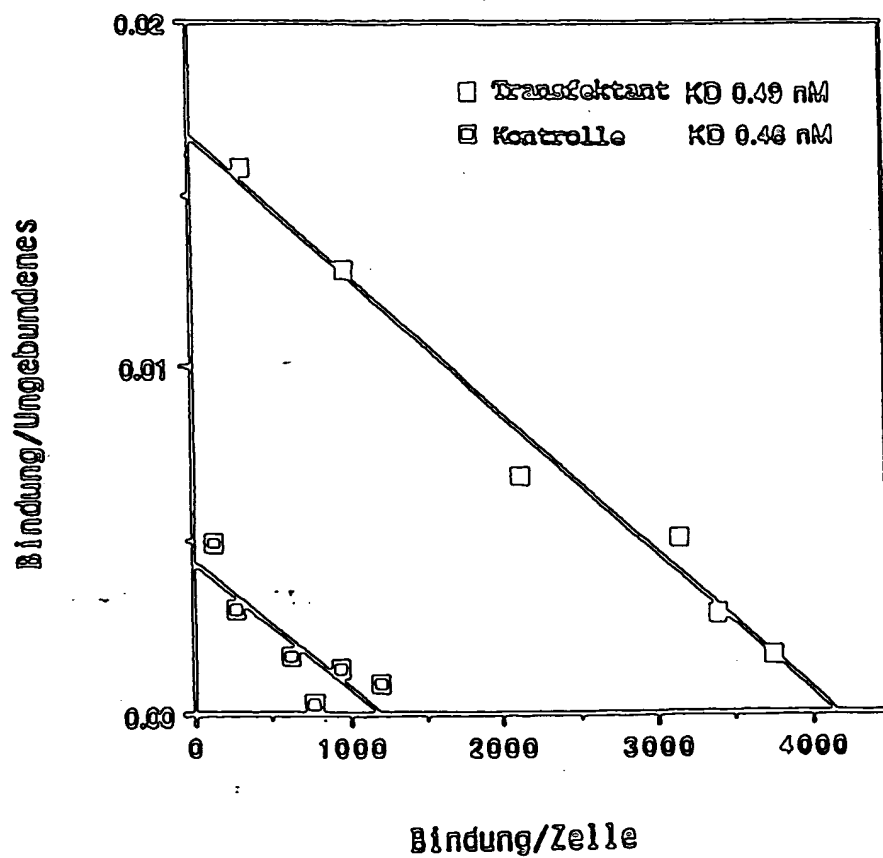
 390 GluLeuLeuGlyArgValLeuArgAspMetAspLeuLeuGlyCysLeuGluAspIleGlu
 1255 GAGCTGCTGGGACGCGTGCTCCGCGACATGGACCTGCTGGGCTGCCTGGAGGACATCGAG

 410 GluAlaLeuCysGlyProAlaAlaLeuProProAlaProSerLeuLeuArg
 1315 GAGGCGCTTTGCGGCCCCGCGCCCTCCCGCCCGCGCCAGTCTTCTCAGATGAGGCTGC
 1375 GCCCCTGCGGGCAGCTCTAAGGACCGTCCTGCGAGATCGCCTTCCAACCCCACTTTTTTC
 1435 TGGAAGGAGGGGTCTGCGAGGGGCAAGCAGGAGCTAGCAGCCGCGCTACTTGGTGCTAAC
 1495 CCCTCGATGTACATAGCTTTTCTCAGCTGCTGCGCGCCGCGCAGTCAAGCGCTGTGCG
 1555 CGCGGAGAGAGGTGCGCCGTGGGCTCAAGAGCCTGAGTGGGTGGTTTTCGAGGATGAGGG
 1615 ACGCTATGCCTCATGCCCCGTTTTGGGTGCTCTCACCAGCAAGGCTGCTCGGGGGCCCCTG
 1675 GTTCGTCCCTGAGCCTTTTTACAGTGCATAAGCAGTTTTTTTTGTTTTGTTTTGTTTT
 1735 GTTTTGTTTTTAAATCAATCATGTTACTAATAGAACTTGGCACTCCTGTGCCCTCTG
 1795 CCTGGACAAGCACATAGCAAGCTGAAGTGTCTAAGGCAGGGGCGAGCACGGAACAATGG
 1855 GGCCTTCAGCTGGAGCTGTGGACTTTTGTACATACTAAATCTGAAGTTAAAAAAA
 1915 AACCCGAATTC

Figur 2A



Figur 2B



Figur 3

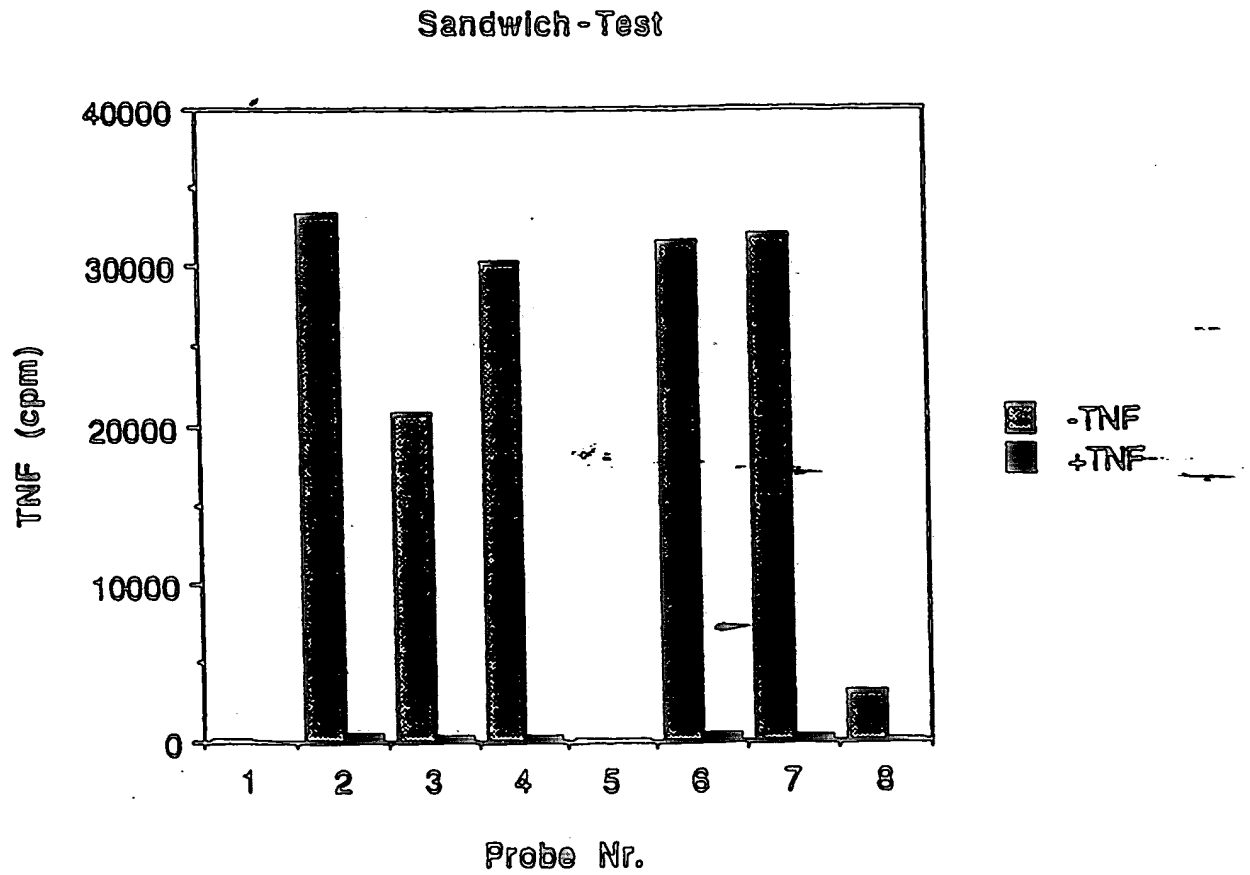


Figure 4

1 SerAspSerValCysAspSerCysGluAspSerThrTyrThrGlnLeuTrpAsnTrpVal
 1 TCGGACTCCGTGTGTGACTCCTGTGAGGACAGCACATACACCCAGCTCTGGAACTGGGTT
 21 ProGluCysLeuSerCysGlySerArgCysSerSerAspGlnValGluThrGlnAlaCys
 61 CCCGAGTGCTTGAGCTGTGGCTCCCGCTGTAGCTCTGACCAGGTGGAACTCAAGGCTTGC
 41 ThrArgGluGlnAsnArgIleCysThrCysArgProGlyTrpTyrCysAlaLeuSerLys
 121 ACTCGGGAACAGAACCCGCATCTGCACCTGCAGGCCCCGGCTGGTACTGCGCGCTGAGCAAG
 61 GlnGluGlyCysArgLeuCysAlaProLeuProLysCysArgProGlyPheGlyValAla
 181 CAGGAGGGGTGCCGGCTGTGCGGCCGCTGCCGAAATGCCGCCCGGGCTTCGGCGTGGCC
 81 ArgProGlyThrGluThrSerAspValValCysLysProCysAlaProGlyThrPheSer
 241 AGACCAAGGAACAGAAACATCAGACGTGGTGTGCAAGCCCTGTGCCCGGGGACGTTCCTCC
 101 AsnThrThrSerSerThrAspIleCysArgProHisGlnIleCysAsnValValAlaIle
 301 AACACGACTTCATCCACGGATATTTGCAGGCCCCACCAAGATCTGTAACTGGTGGCCATC
 121 ProGlyAsnAlaSerArgAspAlaValCysThrSerThrSerProThrArgSerMetAla
 361 CCTGGGAATGCAGGCAAGGGATGCAGTCTGCAGCTCCACGTCCCCACCCGGAGTATGGCC
 141 ProGlyAlaValHisLeuProGlnProValSerThrArgSerGlnHisThrGlnProSer
 421 CCAGGGGCAGTACACTTACCCAGCCAGTGTCCACACGATCCCAACACACGCAGCCAAAT
 161 ProGluProSerThrAlaProSerThrSerPheLeuLeuProMetGlyProSerProPro
 481 CCAGAACCCAGCACTGCTCCAGGACCTCCTTCCTGCTCCCAATGGGCCCCAGCCCCCA
 181 AlaGluGlySerThrGlyAspPheAlaLeuProValGlyLeuIleValGlyValThrAla
 541 GCTGAAGGGGACACTGGCGACTTCGCTCTTCCAGTTGGACTGATTGTGGGTGTGACAGCC
 201 LeuGlyLeuLeuIleIleGlyValValAsnCysValIleMetThrGlnValLysLysLys
 601 TTGGGTCTACTAATAATAAGGAGTGGTGAACCTGTGTTCATCATGACCCAGGTGAAAAAGGAG
 221 ProLeuCysLeuGlnArgGluAlaLysValProHisLeuProAlaAspLysAlaArgGly
 661 CCTTGTGCTGCAAGAGAGAAAGCCAAAGGTGCCCTCACTTGCTGCGATAAAGGCCCGGGT
 241 ThrGlnGlyProGluGlnGlnHisLeuLeuIleThrAlaProSerSerSerSerSerSer
 721 AACAGGGGCCCCAGGACAGCACTGCTGATCACAGGCGCCGAGCTCCAGCAAGCACTCC
 261 LeuGluSerSerAlaSerAlaLeuAspArgArgAlaProThrArgAsnGlnProGlnAla
 781 CTGGAGAGCTCGGCCAGTGGCTTGACAGAGGGGCGCCCACTCGGAACCAAGCCACAGGCA

Figur 4 (Fortsetzung)

281 ProGlyValGluAlaSerGlyAlaGlyGluAlaArgAlaSerThrGlySerSerAlaAsp
841 CCAGGCGTGGAGGCCAGTGGGGCCGGGGAGGCCCGGGCCAGCACCGGGAGCTCAGCAGAT

301 SerSerProGlyGlyHisGlyThrGlnValAsnValThrCysIleValAsnValCysSer
901 TCTTCCCCCTGGTGGCCATGGGACCCAGGTCAATGTCACCTGCATCGTGAACGTCTGTAGC

321 SerSerAspHisSerSerGlnCysSerSerGlnAlaSerSerThrMetGlyAspThrAsp
961 AGCTCTGACCACAGCTCACAGTGCTCCTCCCAAGCCAGCTCCACAATGGGAGACACAGAT

341 SerSerProSerGluSerProLysAspGluGlnValProPheSerLysGluGluCysAla
1021 TCCAGCCCCCTCGGAGTCCCCGAAGGACGAGCAGGTCCCCTTCTCCAAGGAGGAATGTGCC

361 PheArgSerGlnLeuGluThrProGluThrLeuLeuGlySerThrGluGluLysProLeu
1081 TTTCGGTCACAGCTGGAGACGCCAGAGACCCTGCTGGGGAGCACCGAAGAGAAGCCCCCTG

381 ProLeuGlyValProAspAlaGlyMetLysProSer
1141 CCCCTTGGAGTGCCTGATGCTGGGATGAAGCCAGTTAACCAGGCCGGTGTGGGCTGTGT
1201 CGTAGCCAGGTGGCTGAGCCCTGGCAGGATGACCCTGCGAAGGGGCCCTGGTCTTTCCA
1261 GGCCCCCACCCTAGGACTCTGAGGCTCTTTCTGGGCCAAGTTCTCTAGTGCCCTCCAC
1321 AGCCGCAGCCTCCCTCTGACCTGCAGGCCAAGAGCAGAGGCGAGGTTGTGGAAAGCCT
1381 CTGCTGCCATGGCGTGTCCCTCTCGGAAGGCTGGCTGGGCATGGACGTTCTGGGGCATGCT
1441 GGGGCAAGTCCCTGAGTCTCTGTGACCTGCCCCGCCCAGCTGCACCTGCCAGCCTGGCTT
1501 CTGGAGCCCTTGGGTTTTTGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTTCTCCCCCTGGGC
1561 TCTGCCCAGCTCTGGCTCCAGAAACCCAGCATCCTTTTCTGCAGAGGGGCTTTCTGG
1621 AGAGGAGGGATGCTGCCTGAGTCACCCATGAAGACAGGACAGTGCTTCAGCCTGAGGCTG
1681 AGACTGCGGGATGGTCTGGGGCTCTGTGCAGGGAGGAGGTGGCAGCCCTGTAGGGAAAG
1741 GGGTCTTCAAGTTAGCTCAGGAGGCTTGGAAAGCATCACCTCAGGCCAGGTGCAGTGCC
1801 TCACGCCTATGATCCAGCACTTTGGGAGGCTGAGGCGGGTGGATCACCTGAGGTTAGGA
1861 GTTCGAGACCAGCCTGGCCAAACATGGTAAACCCCATCTCTACTAAAATACAGAAATTA
1921 GCCGGGCGTGGTGGCGGGCACCTATAGTCCAGCTACTCAGAAGCCTGAGGCTGGGAAT
1981 CGTTTGAACCCGGGAGCGGAGGTTGCAGGGAGCCGAGATCACGCCACTGCACTCCAGCC
2041 TGGCGCAGAGCGAGAGTCTGTCTCAAAAGAAAAAAAAAAGCACCGCCTCCAAATGCT
2101 AACTTGTCTTTTGTACCATGGTGTGAAGTCAGATGCCAGAGGGGCCAGGCAGGCCAC
2161 CATATTCAAGTGCTGTGGCCTGGGCAAGATAACGCACCTTCTAAGTAGAAATCTGCCAATTT
2221 TTTAAAAAGTAAGTACCCTCAGGCCAACAGCCAAACGACAAAGCCAACTCTGCCAGC
2281 CACATCCAACCCCCCAGCTGCCATTTGCACCTCCGCCTTCACTCCGGTGTGCCTGCAG

19

European Patent Office

11 Publication Number : 0 417 563 A2

12

EUROPEAN PATENT APPLICATION

21 Application Number: 90116707.2

51 Int. Cl.⁵: C07K 15/12, C12N 15/12,

22 Application Date: 08.31.90

C12N 1/21, C07K 3/28,

A61K 39/395

30 Priority: 09.12.89 CH 3319/89

71 Applicant: F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
P.O.B. 3255
CH-4002 Basel (CH)43 Publication Date of Application:
03.20.91 Patent Bulletin 91/1272 Inventor: Dr. Manfred Bröckhaus
Talweg 29
CH-4126 Bettingen(CH)84 Contracting Countries listed:
AT BE CH DE DK FR GB IT LI NLInventor: Dr. Zlatko Dembic
Gempenstrasse 39
CH-4053 Basel (CH)Inventor: Dr. Reiner Gentz
Finkenweg 13

W-7888 Rheinfelden(DE)

Inventor: Dr. Werner Lesslauer
Marignanostrasse 16
D-4059 Basel(CH)Inventor: Dr. Hansruedi Lötscher
Frankenstrasse 18
CH-4313 Möhlin(CH)Inventor: Dr. Ernst-Jürgen Schlaeger
Neue Strasse 63
W-7859 Efringen-Kirchen(DE)74 Representatives: Dr. Wolfgang Mezger
et al
Grenzacherstrasse 124 P.O.B. 3255
CH-4002 Basel(CH)

54 TNF-binding Proteins

57 The present invention relates to non-soluble proteins as well as to their soluble and non-soluble fragments, which bind TNF, in homogeneous form, as well as their physiologically compatible salts, especially such proteins with a molecular mass of 55 or 75 kDa (non-reducing SDS-PAGE conditions), processes for isolation of such protein antibodies against such proteins, DNA sequences, which are coded for non-soluble proteins as well as for their soluble or non-soluble fragments, which bind TNF, as well as those encoded for proteins, consisting in one part of a soluble fragment that binds TNF and in another part of all domains save the first of the constant region of the heavy chain of human immunoglobulins and the recombinant proteins thus encoded as well as processes for their production by means of transformed prokaryotic as well as eukaryotic cells.

TNF-BINDING PROTEINS

The Tumor Necrosis Factor α (TNF α , also cachectin), discovered because of its hemorrhagic-necrotizing effect on certain tumors, and lymphotoxin (TNF β) are two closely related peptide factors [3] of the class of lymphokines/cytokines, which will both from now on be designated as TNF [see survey papers 2 and 3]. TNF disposes over a broad cellular performance spectrum. For instance TNF has an inhibiting or cytotoxic effect on a series of tumor cell lines [2,3], stimulates the proliferation of fibroblasts and the phagocytizing/cytotoxic activity of myeloid cells [4,5,6], induces adhesion molecules in endothelial cells or has an inhibiting effect on endothelium [7,8,9,10], inhibits the synthesis of specific enzymes in adipocytes [11] and induces the expression of histocompatibility antigens [12]. Some of these TNF effects are achieved via induction from other factors or through synergistic effects with other factors, such as interferons or interleukins [13-16], for instance.

TNF is involved in a series of pathological conditions, for instance in shock conditions during meningococcal sepsis [17], during development of autoimmune glomerulonephritis in mice [18] or in case of cerebral malaria in mice [19] and humans [41]. Generally speaking, the toxic effects of endotoxin appear to be transmitted through TNF [20]. Furthermore, TNF can, just like interleukin-1, bring on fever [39]. Based on the pleiotropic functional characteristics of TNF it can be assumed that TNF is a participant in interaction with other cytokines in a whole series of further pathological conditions as mediator of immune response, inflammation or other processes.

These biological effects are transmitted through TNF via specific receptors, with TNF α and TNF β both binding to the same receptors, according to the present

state of knowledge [21]. Different types of cells are differentiated by the number of TNF receptors [22,23,24]. Such quite generally considered TNF binding proteins (TNF-BP) were verified through covalent binding to radioactive marked TNF [24-29], with the following apparent molecular masses of the obtained TNF/TNF-BP complexes having been determined: 95/100 kDa and 75 kDa [24], 95 kDa and 75 kDa [25], 138 kDa, 90 kDa, 75 kDa, and 54 kDa [26]. 100 \pm 5 kDa [27], 97 kDa and 70 kDa [28] and 145 kDa [29]. By means of anti-TNF-antibody-immunoaffinity chromatography and preparative SDS-polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) such a TNF/TNF-BP complex could be isolated [27]. The reductive cleavage of this complex and the subsequent SDS-PAGE analysis resulted in several bands, which were not tested for TNF binding activity, however. Since the specific conditions, which must be employed for cleavage of the complex, lead to an inactivation of the binding protein [31], the latter was made impossible. The enrichment of soluble TNF-BP from human serum or urine by means of ion exchange chromatography and gel filtration (molecular masses in the range of 50 kDa) was described by Olsson et al. [30].

Brockhaus et al. [32] obtained an enriched TNF-BP preparation through TNF α -ligandaffinity chromatography and HPLC from membrane extracts of HL60 cells, which was in turn used as antigen preparation for the production of monoclonal antibodies against TNF-BP. Through use of such an immobilized antibody (immunoaffinity chromatography) an enriched preparation of TNF-BP was obtained by means of TNF α ligandaffinity chromatography and HPLC by Loetscher and Brockhaus [31] from an extract of human placenta, which exhibited a strong wide band at 35 kDa, a weak band at about 40 kDa and a very weak band in the region between 55 kDa and 60 kDa, during the SDS-PAGE analysis. Moreover the gel exhibited a background smear in the region between 33 kDa and 40 kDa. The meaning of the protein bands thus obtained was not clear, however, in view of the heterogeneity of the initial material used (placenta tissue; material combined from several placentas).

The subject of the present invention is non-soluble proteins, i.e., for instance membrane proteins resp. so-called receptors and their soluble or non-soluble fragments, which bind TNF (TNF-BP), in homogeneous form, as well as their physiologically compatible salts. Preferred are those proteins which are characterized, according to SDS-PAGE under non-reducing conditions, by apparent molecular masses of about 55 kDa, 51 kDa, 38 kDa, 36 kDa, 36 kDa and 34 kDa resp. 75 kDa and 65 kDa particularly those with about 55 kDa and 75 kDa. Additionally preferred are those proteins, which are characterized by at least one of the following amino-acid part sequences:

(IA) Leu-Val-Pro-His-Leu-Gly-Asp-Arg-Glu-Lys-Arg-Asp-Ser-Val-Cys-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-X-Asn-Ser-Ile

(IB) Ser-Thr-Pro-Glu-Lys-Glu-Gly-Glu-Leu-Glu-Gly-Thr-Thr-Thr-Lys

(IIA) Ser-Gln-Leu-Glu-Thr-Pro-Glu-Thr-Leu-Leu-Gly-Ser-Thr-Glu-Glu-Lys-Pro-Leu

(IIB) Val-Phe-Cys-Thr

(IIC) Asn-Gln-Pro-Gln-Ala-Pro-Gly-Val-Glu-Ala-Ser-Gly-Ala-Gly-Glu-Ala

(IID) Leu-Pro-Ala-Gln-Val-Ala-Phe-X-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr-Cys

(IIE) Ile-X-Pro-Gly-Phe-Gly-Val-Ala-Tyr-Pro-Ala-Leu-Glu

(IIF) Leu-Cys-Ala-Pro

(IIG) Val-Pro-His-Leu-Pro-Ala-Asp

(IIH) Gly-Ser-Gln-Gly-Pro-Glu-Gln-Gln-X-X-Leu-Ile-X-Ala-Pro where X stands for an amino acid residue that could not be determined unequivocally.

In the state of the technology TNF-BP have already been characterized by an N-terminal partial sequence [European Patent Application Nr. 308 378], with this sequence differing from the N-terminal partial sequence according to the invention according to formula (IA). The TNF binding proteins described in the state of the technology relate by the way to soluble i.e. not membrane-bound TNF-BP isolated from urine and not to membrane-bound, i.e. non-soluble, TNF-BP.

Also subject of the present application are processes for isolation of the TNF-BP according to the invention. These processes are characterized in that basically the following steps of purification are being carried out sequentially: production of a cell extract or tissue extract, immunoaffinity chromatography and/or simple or multiple ligandaffinity chromatography, high pressure liquid chromatography (HPLC) and preparative SDS-polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The combination of the individual purification steps known from the state of current technology is essential for the success of the process according to the invention, with individual steps within the scope of the task to be solved having been modified and improved. For instance the combined immunoaffinity chromatography/TNF- α -ligandaffinity chromatography step, initially used for enrichment of TNF-BP through human placenta [31], was changed in that a BSA-Sepharose 4B - precolumn was used. This precolumn was put in series with the immunoaffinity column and followed by the ligandaffinity column for application of the cell

extract or membrane extract. After application of the extract the two columns mentioned last were decoupled, each eluated separately and the TNF-BP active fractions were purified once more through a ligandaffinity column. Essential for the carrying out of the reverse phase HPLC step according to the invention is the use of a solvent mixture containing a detergent.

Furthermore a technical process to obtain high cell densities of mammalian cells, from which TNF-BP can be isolated, is also a subject of the present invention. Such a process is characterized in that a medium, which was developed for the specific growth requirements of the cell line used, was employed in combination with a perfusion instrument as described in detail in Example 2, for instance. By means of such a process cell densities for HL-60 cells may be increased to as much as 20 times higher than usual.

In addition the present invention relates to DNA sequences, which are coded for proteins that bind TNF and for their soluble and non-soluble fragments. By that we understand for instance DNA sequences that are coded for non-soluble proteins that bind TNF, or for their soluble ~~and~~ non-soluble fragments, with such DNA sequences being selectable from the following:

- (a) DNA sequences, as shown in Fig.1 or Fig.4, as well as their complete strands, or those that include these sequences;
- (b) DNA sequences that hybridize with sequences defined in (a) or with their fragments;
- (c) DNA sequences that do not hybridize with sequences as defined in (a) and (b) because of degeneration of the genetic code, but which code for polypeptides with exactly the same amino-acid sequence.

That means that the present invention includes not only allelic variants but also such DNA sequences that result from deletions, substitutions and additions of one or more nucleotides of the sequences shown in Fig.1 resp. Fig.4, with the thus coded proteins being at all times TNF-BP. A sequence resulting from such a

deletion is described in SCIENCE 248, 1019-1023, (1990), for instance.

Preferred are such DNA sequences that are coded for such a protein with an apparent molecular mass of about 55 kDa, with the sequence shown in Fig.1 being especially preferred as are sequences that are coded for non-soluble or soluble fragments of such proteins. A DNA sequence that is, for instance, coded for such a non-soluble protein fragment stretches from nucleotide -185 to 1122 of the sequence shown in Fig.1. DNA sequences that are coded for soluble protein fragments are, for instance, those that stretch from nucleotide -185 to 633 resp. from nucleotide -14 to 633 of the sequence shown in Fig.1. Also preferred are DNA sequences that are coded for a protein of about 75/65 kDa, with preference for those containing the partial cDNA sequences shown in Fig.4.

Especially preferred DNA sequences in this case are the sequences of the open reading frame from nucleotide 2 to 1'177. The peptides IIA, IIC, IIE, IIF, IIG and IIH are encoded by the partial cDNA sequence in Fig.4, where the slight deviations in the experimentally determined amino acid sequences from the sequence derived from cDNA are most probably caused by the smaller resolution of gas phase sequencing. Also preferred are DNA sequences, which are coded for non-soluble as well as soluble fragments of TNF binding proteins with an apparent molecular mass of 75 kDa/65 kDa. DNA sequences for such soluble fragments can be determined based on the hydrophilia profiles of the amino sequences derived from nucleic acids coded for such non-soluble TNF-BP.

The invention relates furthermore to DNA sequences, which comprise a combination of two partial DNA sequences, with one partial sequence being coded for such soluble fragments of non-soluble proteins which bind TNF (above) while the other partial sequence is coded for all the domains, save the first domain of the constant region of the heavy chain of human immunoglobulins, like IgG, IgA, IgM resp. IgE.

The present invention relates naturally also to recombinant proteins encoded by such DNA sequences. It is self-evident that such proteins, in whose amino acid sequences amino acids have been exchanged, for instance by means of directed mutagenesis, in such a way that the activity of the TNF-BP or their fragments, specifically the binding of TNF or the interaction with other membrane components involved in the signal transmission, were changed or retained in a desired manner, are also included. Amino acid exchanges in proteins and peptides, which in general do not change the activity of such molecules, are known in the current state of technology and have been described, for instance, by H. Neurath and R.L. Hill in "The Proteins" (Academic Press, New York 1979, see in particular Fig.6, page 14). The exchanges occurring most frequently are: Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala,Val, Ser/Gly Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn,

Leu/Ile, Leu Val, Ala/Glu, Asp/Gly, as well as in reverse direction. The present invention relates further to vectors that contain DNA sequences according to the invention and are suitable for the transformation of suitable prokaryotic as well as eukaryotic host systems, with such vectors being preferred whose use leads to the expression of the proteins encoded by the DNA sequences according to the invention. Finally the invention relates also to prokaryotic as well as eukaryotic host systems transformed with such vectors, such as processes for production of recombinant combinations through cultivation of such host systems and subsequent isolation of these combinations from the host systems themselves or from their culture supernatants.

Also subject of the present invention are pharmaceutical preparations, which contain at least one of these TNF-BP or their fragments, if so desired in combination with additional pharmaceutically active substances and/or non-toxic, inert, therapeutically compatible carrier materials.

The present invention relates finally to the use of such TNF-BP on the one hand for production of pharmaceutical preparations, resp. on the other hand to the treatment of diseases, preferably those in the course of which TNF is involved.

The starting material for the TNF-BP according to the invention are in general cells that contain such TNF-BP in membrane-bound form and which are generally available to the specialist without any restrictions, like for instance HL60- [ATCC Nr. CCL 240], U 937- [ATCC Nr. CRL 1593], SW 480- [ATCC Nr. CCL 228] and HEP2 cells [ATCC Nr. CCL 23]. These cells may be cultivated according to known methods of the current state of technology [40] or for the attainment of high cell densities by means of the already in general and in detail described process for HL60 cells in example 2. TNF-BP may then be extracted according to known methods of the current state of technology by means of suitable detergents, for instance Triton X-114, 1-O-n-octyl- β -D-glucopyranoside (octylglucoside), or 3-[(3-cholylamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS) , particularly

by means of Triton X-100, from the cells that have been centrifuged off the medium and washed. The usually employed methods of identification for TNF-BP, for instance a polyethylene glycol-induced precipitation of the ^{125}I -TNF/TNF-BP complex [27], in particular filter binding tests with radioactively marked TNF according to Example 1, may be used. The current state of technology methods generally employed for purification of proteins, particularly of membrane proteins, such as ion exchange chromatography, gel filtration, affinity chromatography, HPLC and SDS-PAGE, may be used for the recovery of the TNF-BP according to the invention. Particularly preferred methods for the production of TNF-BP according to the invention are affinity chromatography, particularly with TNF- α as the ligand tied to the solid phase and immunoaffinity chromatography, HPL and SDS-PAGE. The elution of TNF-BP bands separated by means of SDS-PAGE can occur according to known methods of protein chemistry, for instance by means of electro-elution according to Hunkapiller et al. [34], with the electro dialysis times listed there to be doubled in general according to the present state of knowledge. Still remaining traces of SDS may then be removed according to Bosserhoff et al. [50].

Having been thus purified the TNF-BP may be characterized by means of the methods of peptide chemistry known at the current state of technology, as for instance N-terminal amino acid sequencing or enzymatic as well as chemical peptide cleavage. Fragments obtained through enzymatic or chemical cleavage may be separated by familiar methods, like HPLC for instance and then be subject of N-terminal sequencing themselves. Such fragments, which still bind TNF, may be identified by means of the methods of identification for TNF-BP listed above and are also a subject of the present invention.

Starting with the information about amino acid sequences or about the DNA sequences as well as amino acid sequences shown in Fig.1 and Fig.4 thus obtainable suitable oligonucleotides may be produced with methods known at the current state of technology while observing the genetic code degeneration [51]. With them and by again using well known methods of molecular biology [42,43] cDNA banks or genomic DNA banks may be scanned for clones containing nucleic acid sequences encoded for TNF-BP. In addition cDNA fragments may be cloned by means of the polymerase chain reaction (PCR)[49] by inserting completely degenerated and due to their complementarity suitable oligonucleotides that come from separate, relatively short sections of the amino acid sequence and by observing the genetic code, as "primers", which enables amplification and identification of the fragment that lies between these two sequences. Determination of the nucleotide sequence of such a fragment makes possible an independent determination of the amino acid sequence of the protein fragment for which it is encoded. The cDNA fragments obtainable through PCR may also be used, as already described for the oligonucleotides proper, by means of known methods, for the search for clones encoded for TNF-BP and containing nucleic acid sequences from cDNA banks resp. genomic DNA banks. Such nucleic acid sequences can then be sequenced according to known methods [42]. Based on the sequences thus determined as well as on those already known for certain receptors, such partial sequences which are encoded for soluble TNF-BP

fragments, may be determined and cut out from the total sequence by means of known methods [42].

The total sequence or such partial sequences may then be integrated by means of known methods into vectors described in the current state of technology for their multiplication and as well as expression in prokaryotes [42]. Suitable prokaryotic host organisms are for instance gram-negative as well as gram-positive bacteria, like for instance *E. coli* strains, like *E. coli* HB 101 [ATCC Nr. 33 694] or *E. coli* W3110 [ATCC Nr. 27 325] or *B. subtilis* strains.

Furthermore nucleic acid sequences according to the invention, which are encoded for TNF-BP as well as for TNF-BP fragments, may be integrated into suitable vectors for proliferation as well as expression in eukaryotic host cells, like for instance yeast, insect cells and mammal cells, by means of known methods. Expression of such sequences occurs preferably in mammal as well as in insect cells.

A typical expression vector for mammal cells contains an efficient promoter element, for achievement of a good transcription rate, the DNA sequence to be expressed and signals for an efficient termination and polyadenylation of the transcript. Additional elements that can be used are "enhancers", which lead to further amplified transcription and sequences, which may for instance effect a longer biological half-life for the mRNA. For the expression of nucleic acid sequences in which the endogene sequence piece encoded for a signal peptide is missing, vectors may be used that contain such suitable sequences encoded for signal peptides of other known peptides. See for instance the vector pLJ268 described by Cullen, B.R. in *Cell* 46, 973-982(1986) or also by Sharms, S. et al. in "Current Communications in Molecular Biology", ed. by Gething, M.J. Cold Spring Harbor Lab.(1985), pages 73-78.

Most of the vectors used for a transient expression of a specific DNA sequence in mammal cells contain the replication origin of the SV40 virus. In cells that express the T-antigen of the virus, (for instance COS cells), these vectors pro-

liferate strongly. But a temporary expression is not limited to COS cells. In principle any mammal cell may be used for that purpose. Signals that can effect a strong transcription are, for instance, the early and late promoters of SV40, the promoter and enhancer of the "major immediate-early" gene of HCMV (human cytomegalovirus), the LTR's ("long terminal repeats") of retroviruses, like for instance RSV, HIV and MMTV. But signals from cellular genes, like for instance the promoters of the actin genes and collagenase genes, can be used.

Alternatively, stable cell lines that have integrated the specific DNA sequence in the genome (chromosome), may be obtained. For that the DNA sequence is co-transfected together with a selectable marker, for instance neomycin, hygromycin, dihydrofolate-reductase (dhfr) or hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase (hgbt).

The DNA sequence which is stably built into the chromosome can also be considerably increased. A suitable selection marker for it is the dihydrofolate-reductase (dhfr) for example. Mammal cells (for instance CHO cells), which contain no intact dhfr gene, will in that case be incubated with increasing amounts of methotrexate after completed transfection. In that way cell lines can be preserved that contain more than a thousand copies of the desired DNA sequence.

Mammal cells, which can be used for the expression, are for example cells of the human cell lines Hela [ATCC CCL2] and 293 [ATCC CRL 1573], as well as 3T3- [ATCC CCL 163] and L cells, for instance [ATCC CCL 149], (CHO) cells [ATCC CCL 61], BHK [ATCC CCL 10] cells as well as the CV 1 [ATCC CCL 70] cell lines and the COS cell lines [ATCC CRL 1650, CRL 1651].

Suitable expression vectors include for example vectors like pBC12MI [ATCC 67 109], pSV2dhfr [ATCC 37 146], pSVL [Pharmacia, Uppsala, Sweden], pRSVCat [ATCC 37 152] and pMSG [Pharmacia, Uppsala, Sweden]. Particularly preferred vectors are the vectors "pK19" and "pN123" used in Example 9. These can be isolated from the E. coli strains HB101(pK19) and HB101(pN123), which are transformed with them, by means of known methods [42]. These E. coli strains were deposited on 26. January 1990 with the German Collection of Micro-Organisms and Cell Cultures, Inc. (DSM) in Braunschweig (BRD) [form. West Germany ..Transl.] under DSM 5761 for HB101(pK19) and DMS 5764 for HB101(pN123). For the expression of proteins, which consist of a soluble fragment from non-soluble TNF-BP and an immunoglobulin component, i.e. all domains but the first from the constant region of the heavy chain, vectors derived from pSV2 like for example described by German, C. in "DNA Cloning" [Vol. II. ed by Glover, D.M., IRL Press Oxford, 1985], are particularly suitable. Particularly preferred vectors are the vectors pCD4-Hu (DSM 5315), pCD4-H 1 (DSM 5314) and pCD4-H 3 (DSM 5523), which are deposited with the German Collection of Micro-Organisms and Cell Cultures, Inc. (DSM) in Braunschweig, BRD and described in detail in the European Patent Application Nr. 90107393.2. The said European patent

specification mentioned, as well as the equivalent patent applications listed in Example 11, also contain material relating to the further use of these vectors for the expression of such chimeric proteins with other immunoglobulin components.

The nature and manner in which the cells are being transfected depends on the expression system and vector system chosen. A survey of these methods is found for example at Pollard et al. , "DNA Transformation of Mammalian Cells" in "Methods of Molecular Biology" [Nucleic Acids Vol.2, 1984, Walker, J.M., ed, Humana, Clifton, New Jersey]. Further methods are found at Chen and Okayama [" High-Efficiency Transformation of Mammalian Cells by Plasmid DNA", Molecular and Cell Biology 7, 2745-2752, 1987] and at Felgner [Felgner et al., "Lipofectin: a highly efficient lipid-mediated DNA-transfection procedure", Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417, 1987].

For the expression in insect cells the Baculovirus-Expression-System, which has already been employed successfully for the expression of a series of proteins, (for a summary see Luckow and Summers, Bio/Technology 6, 47-55, 1988), can be used. Recombinant proteins can be produced authentically or as fusion proteins. The proteins thus produced may also be modified, for example be glycosylized (Smith et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82, 8404-8408, 1987). To produce a recombinant Baculovirus, which expresses the desired protein, a so-called "transfer vector " is employed. This is understood to be a plasmid, which contains the heterologous DNA sequence under control of a strong promoter, for instance that of the polyhedrin gene, with the sequence being surrounded on both sides by viral sequences. Particularly preferred vectors are "pN113", "pN119" and "pN124", the vectors used in Example 10. These can be isolated according to known methods [42] from the E. coli strains HB101(pN113), HB101(pN119) and HB101(pN124). These E. coli strains were deposited with the German Collection of Micro-Organisms and Cell Cultures, Inc.

(DSM) in Braunschweig, BRD, under DSM 5762 for HB101(pN113), DSM 5763 for HB101(pN119) and DSM 5765 for HB101(pN124). The transfer vector is then transfected together with DNA from the wild type Baculovirus into the insect cells. The recombinant viruses that are generated in the cells through homologous recombination may then be identified and isolated according to known methods. A survey about the Baculovirus-Expression-System is found at Luckow and Summers [52].

Expressed TNF-BP as well as their non-soluble and soluble fragments can then be purified out through methods of the protein chemistry known at the current state of the technology, as for example the methods already described on pages 5-6, from the cell mass and or the culture supernatants.

The TNF-BP recovered according to the invention may also be used for the production of polyclonal and monoclonal antibodies according to known methods of the technology [44,45] or according to the method described in Example 3.

Such antibodies, particularly monoclonal antibodies against the 75 kDa TNF-BP species, are also a subject of the present invention. Such antibodies directed against the 75 kDa TNF-BP can be employed for isolation of TNF-BP by means of modifications familiar to the specialist to the purification method described in detail in Examples 4-6.

Based on the high binding affinity for TNF of the TNF-BP according to the invention (K_d values of the orders of magnitude of 10^{-9} - 10^{-10} M) they or fragments thereof may be used as diagnostics for identification of TNF in serum or in other body fluids according to methods known at the current state of technology, for instance in solid phase binding tests or in combination with anti-TNF-BP antibodies on so-called "sandwich" tests.

In general TNF-BP may be used according to the invention for purification of TNF on the one hand and for the location of TNF-agonists as well as TNF-antagonists by means of methods known at the current state of technology on the other.

The TNF-BP according to the invention as well as their physiologically compatible salts, which can be produced according to the methods known at the current state of technology, may also be used for production of pharmaceutical preparations in particular those for treatment of diseases in the course of which TNF is involved. One or several of the mentioned compounds, if desired resp. required in combination with other pharmaceutically active substances, may be processed in a known manner with the usually employed solid or liquid carrier materials. The dosage of such preparations can occur with reference to the usual criteria in analogy to preparations of similar activity and structure already in use.

After having described the above invention in general, the following examples are to illustrate details of the invention without limiting it by that in any way.

Example 1Detection of TNF-binding Proteins

The TNF-BP were detected in a filter test with human radioactive iodine ^{125}I -TNF. TNF (46,47) was marked radiactively with Na^{125}I (IMS40, Amersham, Amersham, England) and Iodo-Gen (#28600, Pierce Eurochemie, Oud-Beijerland, Netherlands) according to Fraker and Speck [48]. Isolated membranes of the cells or their solubilized, enriched and purified fractions, were applied to wetted cellulose nitrate filters ($0.45\ \mu$, Bio.Rad, Richmond, CA, USA) for detection of the TNF-BP. The filter was then blocked in buffer solution with 1% of defatted powdered milk and subsequently incubated, washed and airdried with $5 \cdot 10^5$ cpm/ml ^{125}I -TNF α (0.3 - $1.0 \cdot 10^8$ cpm/ μg) in two batches with and without addition of $5\ \mu\text{g/ml}$ of unmarked TNF α . The bound radioactivity was detected through autoradiography semiquantitatively or counted in a γ -counter. The specific ^{125}I -TNF α binding was obtained after correction for nonspecific binding in the presence of unmarked TNF- α in the surplus. The specific TNF binding during the filter test was measured at various TNF concentrations and analyzed according to Scatchard [33], with a K_d value of $\sim 10^{-9}$ - $1 \cdot 10^{-10}$ having been obtained.

Example 2Cell Extracts from HL-60 Cells

HL60 cells [ATCC Nr. CCL 240] were cultivated on an experimental laboratory scale in an RPMI 1640-Medium [GIBCO catalog Nr. 074-01800], that also contained $2\ \text{g/l}$ NaHCO_3 and 5% total calves' serum, within an atmosphere of 5% CO_2 and were subsequently centrifuged.

The following procedure was used to obtain high cell densities on a technical scale. Breeding was carried out in a 75 liter airlift fermenter (Chemap. Co. Swi-

tzerland) with 58 liter of working volume. For that purpose the cassette membrane system "PROSTAK" (Millipore, Switzerland) with a membrane surface of 0.32 m^2 (1 cassette) was integrated into the external circulation. The culture medium (see Table 1) was recirculated at 5 l/min. with a Watson-Marlow pump Type 603U. After sterilization of the equipment with steam, with the "PROSTAK" system being separately autoclaved, fermentation was started with growing HL-60 cells from a 20 l airlift fermenter (Chemap). Cell breeding in the seed fermenter was carried out in the medium through a conventional batch process according to Table 1 and an initial cell titre of 2×10^5 cells/ml. After 4 days the HL60 batch with a titre of 4.9×10^6 cells/ml was transferred to the 75 l fermenter. The pH value was kept at 7.1 and the pO_2 value at 25% saturation, with oxygen being fed through a micro-porous frit. After initial batch formation the perfusion was started on the second day with a cell titre of 4×10^6 cells/ml at a medium exchange rate of 30 l per day. On the filtrate side of the membrane the conditioned medium was withdrawn and replaced by inflow of fresh medium. The inflowing medium was strengthened as follows: primatone from 0.25% to 0.35%, glutamin from 5 mM to 6 mM and glucose from 4 g/l to 6 g/l. The perfusion rate was then raised on the third and fourth day to 72 l of medium/day and on the fifth day to 100 l of medium/day. After 120 hours of continuous breeding the fermentation was finished. Exponential cell growth up to 40×10^6 cells/ml occurred under the given conditions of fermentation. The period for doubling the cell population was 20-22 hours up to 10×10^6 cells/ml and increased to 30-36 hours with increasing cell density. The share of the living cells was around 90-95% during the entire period of fermentation. The HL-60 batch was then cooled down to about 12°C in the fermenter and the cells were recovered through centrifugation (Beckmann centrifuge [model J-6B, rotor JS], 3000 rpm, 10 min., 4°C).

Table 1HL -60 Medium

Components	Concentrations mg/l
CaCl_2 (moisture free)	112,644
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	20
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$0.498 \cdot 10^{-3}$
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0.02
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1668
KCl	336.72
KNO_3	0.0309
MgCl_2 (moisture free)	11.444
MgSO_4 (moisture free)	68.37
NaCl	5801.8
Na_2HPO_4 (moisture free)	188,408
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	75
$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$9.6 \cdot 10^{-3}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1726
D-Glucose	4000
Glutathion (red.)	0.2
Hepes-Buffer	2383.2
Hypoxanthin	0.954
Linoleic Acid	0.0168
Liponic Acid	0.042
Phenol Red	10.24
Putrescin 2HCl	0.0322
Na-Pyruvat	88
Thymidin	0.146

Biotin	0.04666
D-Ca-Pantothenate	2.546
Choline Chloride	5.792
Folic Acid	2.86
i-Inositol	11.32
Niacin Amide	2.6
para- Amino-Benzoic Acid	0.2
Pyridoxal HCL	2.4124
Pyridoxin HCL	0.2
Riboflavin	0.2876
Thiamin HCL	2.668
Vitamin B ₁₂	0.2782
L- Alanine	11.78
L- Asparagine Acid	10
L- Asparagine H ₂ O	14.362
L- Arginine	40
L- Arginine HCl	92.6
L- Aspartate	33.32
L- Cystine 2HCl	62.04
L- Cysteine HCl •H ₂ O	7.024
L- Glutamine Acid	36.94
L- Glutamine	730
L- Glycine	21.5
L- Histidine	3
L- Histidine HCl •H ₂ O	27.392
L- Hydroxypyroline	4
L- Isoleucine	73.788
L- Leucine	75.62

L- Lysine HCl	102.9
L- Methionine	21.896
L- Phenylalanine	43.592
L- Proline	26.9
L- Serine	31.3
L- Threonine	53
L- Tryptophan	11.008
L- Tyrosine •2Na	69.76
L- Valine	62.74
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml
Insulin (human)	5 µg/ml
Transferrin (human)	15 µg/ml
Bovine Serum Albumin	67 µg/ml
Primatone RL (Sheffield Products, Norwich, N.Y., USA)	0.25%
Pluronic F68 (Serva, Heidelberg, BRD)	0.01%
Fetal Calves' Serum	0.3-3%

The centrifugate was washed with isotonic phosphate buffer (PBS; 0,2g/l KCl, 0.2 g/l KH_2PO_4 , 8.0 g/l NaCl, 2.16 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), to which were added 5% dimethyl formamide, 10 mM benzamidine, 100 E/ml aprotinine, 10 µM leupeptine, 1 µM pepstatine, 1 mM o-pheanthroline, 5 mM iodacetamide, 1mM phenylmethylsulphonyl fluoride (and which will be referred to as PBS-M from now on). The washed cells were extracted at a cell density of $2.5 \cdot 10^8$ cells/ml in PBS-M with Triton X-100 (final concentration 1.0%). The cell extract was clarified through centrifugation (15'000 x g, 1 hour; 100'000 x g, 1 hour).

Example 3Production of monoclonal (TNF-BP) Antibodies

A supernatant of centrifugation obtained according to Example 2 from cultivation of HL60 cells on an experimental laboratory scale was diluted 1:10 with PBS. The diluted supernatant was applied at 4°C to a column (flow rate: 0.2 ml/min), which contained 2 ml Affigel 10 (Bio Rad catalog Nr. 153-6099), to which 20 mg of recombinant human TNF- α [Pennica, D. et al. (1984) *Nature* 312, 724; Shirai, T. et al. (1985) *Nature* 313, 803; Wang, A.M. et al. (1985) *Science* 228, 149] were coupled according to the suggestions of the manufacturer. The column was washed at 4°C and a flow-through rate of 1 ml/min first with 20 ml of PBS containing 0.1% Triton X 114 and then with 20 ml PBS. The thus enriched TNF-BP was eluted at 22°C and a flow rate of 2 ml/min with 4 ml of 100 mM glycine, pH 2.8, 0.1% decylmaltoside. The eluate was concentrated to 10 μ l in a Centricon 30 unit [Amicon].

10 μ l of this eluate were mixed with 20 μ l of complete Freund's adjuvant to an emulsion. According to the procedure described by Holmdahl, R. et al. [(1985), *J. Immunol. Methods* 83 379] 10 μ l of the emulsion were injected on days 0, 7 and 12 into a rear paw of an anesthetized Balb/c mouse.

On day 14 the immunized mouse was killed, the popliteal lymph node removed, chopped up and suspended in Iscove's medium (MEM, GIBCO catalog Nr. 074-2200), which contained 2 g/l NaHCO₃, through repeated pipetting. According to a modified procedure by De St. Groth and Scheidegger [*J. Immunol. Methods* (1980), 35, 1] 5×10^7 cells of the lymph node were fused with 5×10^7 PAI mouse myeloma cells (J.W. Stocker et al., *Research Disclosure*, 217, May 1982, 155-157), which were in the process of logarithmic growth. The cells were mixed, collected through centrifugation then resuspended through gentle shaking in 2 ml 50% (v/v) polyethylene glycol in IMEM at room temperature and diluted through slow addition of 10 ml IMEM during 10 minutes of careful shaking. The cells were collected through centrifugation and re-

suspended in 200 ml of the complete medium [IMEM + 20% fetal calves' serum, glutamine (2.0 mM), 2-mercaptoethanol (100 μ M), 100 μ M hypoxanthine, 0.4 μ M aminopterin and 16 μ M thymidine (HAT)]. The suspension was distributed among 10 tissue culture dishes, each with 96 indentations and, without change of medium, incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ and at relative humidity of 98%, for 11 days.

The antibodies are characterized by their inhibiting effect to TNF binding with HL60 cells or through their binding to antigen during the filter test according to Example 1. The following procedure was employed for detection of biological activity of anti-(TNF-BP)-antibodies : 5×10^6 HL60 or U937 cells were incubated in the complete RPMI 1640 medium together with affinity-free monoclonal anti-(TNF-BP) antibodies or control antibodies (i.e. those that are not directed against TNF-BP) in a concentration range of 1 ng/ml to 10 μ g/ml. After an hour of incubation at 37°C the cells were collected through centrifugation and washed with 4.5 ml PBS at 0°C. They were resuspended in 1 ml of complete RPMI 1640 medium (Example 2), which contained additional 0.1% sodium azide and ^{125}I -TNF α (10^6 cpm/ml) with or without addition of unmarked TNF α (see above). ~~The~~ specific radioactivity of ^{125}I -TNF α amounted to 700 Ci/mmol. The cells were incubated for 2 hours at 4°C, collected and washed four times with 4.5 ml PBS, which contained 1% BSA and 0.001% Triton X 100 (Fluka), at 0°C. The radioactivity linked to the cells was measured in a γ -scintillation counter. In a comparable experiment the radioactivity linked to cells that were not treated with anti-(TNF-BP) antibodies was determined (about 10,000 cpm/ 5×10^6 cells).

Example 4

Affinity Chromatography

For further purification a monoclonal anti-(44 kDa TNF-BP) antibody (2.8 mg/ml gel), as obtained according to Example 3, TNF (3.0 mg/ml gel) and bovine serum albumin (BSA, 8.5 mg/ml gel) were coupled covalent to CNBr-activated Sepharose 4B

(Pharmacia, Uppsala, Sweden). The cell extract obtained according to Example 2 was fed through the thus established columns which were arranged in series in the following sequence: BSA-Sepharose precolumn, immunoaffinity column [anti-(55 kDa-TNF-BP)-antibody], TNF α -ligand affinity column. After the completed task the two last mentioned columns were separated and individually washed with 100 ml each of the following buffer solutions: (1) PBS, 1.0% Triton X-100, 10 mM benzamidine, 100 E/ml aprotinine; (2) PBS, 0.1% Triton X-100, 0.5 M NaCl, 10 mM benzamidine, 100 E/ml aprotinine; and (3) PBS, 0.1% Triton X-100, 10mM benzamidine, 100 E/ml aprotinine. The immunoaffinity column as well as the TNF α -ligandaffinity column were then eluated, each one separately, with 100 mM glycine pH 2.5, 100 mM NaCl, 0.2% decylmaltoside, 10 mM benzamidine, 100 E/ml aprotinine. The fractions of each column that were active during the filter test as per Example 1 were always united afterwards and neutralized with 1 M Tris pH 8.0 .

The united TNF-BP active fractions of immunoaffinity chromatography on the one hand and of TNF α - ligandaffinity chromatography on the other were once more applied each to a small TNF α - ligandaffinity column for further purification. Afterwards these two columns were washed each with 40 ml of (1) PBS, 1.0% Triton X-100, 10 mM benzamidine, 100 E/ml aprotinine, (2) PBS, 0.1% Triton X-100, 0.5 M NaCl, 10 mM ATP, 10 mM benzamidine, 100 E/ml aprotinine, (3) PBS, 0.1% Triton X-100, (4) 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.0% NP-40, 1.0% desoxycholate, 0.1% SDS, (5) PBS, 0.2% decymatoside .Subsequently the columns were eluated with 100 mM glycine pH 2.5, 100 mM NaCl, 0,2% decylmaltoside. Fractions of 0.5 ml from each column were collected separately and the active fractions per filter test (Example 1) of each column united each separately and concentrated in a Centricon unit (Amicon, Molecular weight exclusion 10'000).

Example 5

Separation by means of HPLC

The active fractions obtained according to Example 4 were applied with reference to the different origins (immunoaffinity chromatography resp. ligandaffinity chromatography) each separately to C1/C8 reversed-phase HPLC columns (ProRPC, Pharmacia, 5x20 mm), which had been equilibrated with 0.1% trifluoroacetic acid, 0.1% octylglucoside. The columns were then eluted with a linear acetonitrile gradient (0-80%) in the same buffer with a flow of 0.5 ml/min. Fractions of 1.0 ml were collected from each column and the active fractions from each column were separately united (detection per Example 1).

Example 6

Separation by means of SDS-PAGE

The active fractions obtained according to Example 5 and per filter test (Example 1) were further separated according to [34]. For that purpose the probes were heated for three minutes to 95°C in SDS probe buffer and subsequently separated electrophoretically on a 12% acrylamide separation gel with a 5% collecting gel. As reference for determination of the apparent molecular masses on the SDS-PAGE gel the following reference proteins were used: phosphorylase B (97.4 kDa), BSA (66.2 kDa), ovalbumin (42.7 kDa), Carboanhydrase (31.0 kDa), soy trypsin inhibitor (21.5 kDa) and lysozyme (14.4 kDa).

Under the conditions mentioned two bands of 55 kDa and 51 kDa as well as three weaker bands of 38 kDa, 36 kDa and 34 kDa were obtained for probes that had been obtained according to Example 4 through TNF α -ligandaffinity chromatography from immunoaffinity chromatography eluates and had been further separated through HPLC according to Example 5. These bands were transferred electrophoretically in a Mini Trans Blot System (Bio Rad, Richmond, CA, USA) for 1 hour at 100 V in 25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol to a PVDF membrane (Immobilon, Millipore, Bedford, Mass. USA). Afterwards the PVDF membrane was dyed either with 0.15% Serva-Blau (Serva, Heidelberg, BRD) in methanol/water/glacial acetic acid (50/40/10 parts by volume) to protein or blocked with defatted powdered milk and subse-

quently incubated with ^{125}I -TNF α according to the filter test conditions described in Example 1 for the detection of bands with TNF-BP activity. It was shown that all the bands exhibited in the protein color specifically bound TNF α . All these bands bound in the Western blot according to Towbin et al. [38] including the monoclonal anti-55 kDa-TNF-BP- antibody produced according to Example 3. In that case a rabbit-anti-mouse -immunoglobulin antibody marked by Na ^{125}I radioactively affinity-free(mouse immunoglobulin -Sephrose-4B affinity column) according to the process described in Example 1 was employed for autoradiographic detection of this antibody.

Probes, which are obtained according to Example 4 through double TNF α - ligandaffinity chromatography of the flowthrough of immunoaffinity chromatography and are further separated through HPLC according to Example 5, showed two additional bands of 75 kDa and 65 kDa, both of which bound TNF specifically during the filter test (Example 1). In the Western blot according to Towbin et al. (see above) the proteins of these two bands did not react with the anti-(55 kDa TNF-BP)- antibody produced according to Example 3. They did react, however, with a monoclonal antibody, which had been produced according to Example 3 starting from the 75 kDa band (anti-75 kDa TNF-BP-antibody).

Example 7

Amino Acid Sequence Analysis

For amino acid sequence analysis the active fractions obtained according to Example 5 and per filter test (Example 1) were separated by means of the SDS-PAGE conditions described in Example 6 and now being reduced (SDS probe buffer with 125 mM dithiothreitol). The same bands were found as per Example 6, but they all showed about 1-2 kDa higher molecular masses in comparison with Example 6 because of the reducing conditions of SDS-PAGE. These bands were then transferred according to Example 6 to PVDF membranes and dyed with 0.15% 35 Serva-Blau in methanol/water/glacial acetic acid (50/40/10 parts per volume) during 1 minute,

decolored with methanol/water/glacial acetic acid (45/48/7 parts by volume), rinsed with water, airdried and then cut out. During all the steps the conditions given by Hunkapiller [34] were followed to avoid N-terminal blockage. At first the purified TNF-BP were placed unchanged into the amino acid sequencing. To obtain additional sequence information, the TNF-BP were cleaved with bromocyanide (Tarr, G.E. in "Methods of Protein Microcharacterization", 165-166 op. cit.), trypsin and/or proteinase K, after reduction and S-carboxymethylation [Jones, B.N.(1986) in "Methods of Microcharacterization", J.E. Shively, ed. Human Press, Clifton N.J. 124-125] and the peptides were separated by means of HPLC according to known methods of protein chemistry. So prepared the probes were then sequenced in an automated gas phase-microsequencing apparatus (Applied Biosystems Model 470A, ABI, Foster City, CA, USA) with an on-line automated HPLC PTH- amino acid analyzer (Applied Biosystems Model 120, ABI see above) behind it, with the following amino acid sequences being determined :

1. For the 55 kDa band (according to non-reducing SDS-PAGE):

Leu-Val-Pro-His-Leu-Gly-Asp-Arg-Glu-Lys-Arg-Asp-Ser-Val-Cys-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-X-Asn-Ser-Ile

and

Ser-Thr-Pro-Glu-Lys-Glu-Gly-Glu-Leu-Glu-Gly-Thr-Thr-Thr-Lys

where X stands for an amino acid residue that could not be identified.

2. For the 51 kDa and the 38 kDa bands (according to non-reducing SDS-PAGE):

Leu-Val-Pro-His-Leu-Gly-Asp-Arg-Glu

3. For the 65 kDa band (according to non-reducing SDS-PAGE): during N-terminal sequencing of the 65 kDa band two parallel sequences were identified without interruption down to the 15th residue. Since one of the sequences corresponded to a partial sequence of ubiquitin [36,37] the following sequence was derived for the 65 kDa band:

Leu-Pro-Ala-Gln-Val-Ala-Phe-X-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr-Cys.

where X stands for an amino acid residue that could not be identified.

Additional peptide sequences for 75(65)kDa-TNF-BP were identified:

Ile-X-Pro-Gly-Phe-Gly-Val-Ala-Tyr-Pro-Ala-Leu-Glu

and

Ser-Gln-Leu-Glu-Thr-Pro-Glu-Thr-LeuLeu-Gly-Ser-Thr-Glu-Glu-Lys-Pro-Leu

and

Val-Phe-Cys-Thr

and

Asn-Gln-Pro-Gln-Ala-Pro-Gly-Val-Glu-Ala-Ser-Gly-Ala-Gly-Glu-Ala

and

Leu-Cys-Ala-Pro

and

Val-Pro-His-Leu-Pro-Ala-Asp

and

Gly-Ser-Gln-Gly-Pro-Glu-Gln-Gln-X-X-Leu-Ile-X-Ala-Pro

Where X stands for an amino acid residue that could not be identified.

Example 8

Analysis of Base Sequences of Complementary DNA (cDNA)

Starting with the amino acid sequence according to formula AI, complete degenerated oligonucleotides corresponding to amino acid residues 2-7 and 17-23 were, with consideration of the genetic code, synthesized in suitable complementarity ("sense" and "antisense" oligonucleotide). Total cellular RNA was isolated from HL60 cells [42,43], and the first strand of cDNA was synthesized through oligo-dT-priming or through priming with the "antisense" oligonucleotide by means of a cDNA synthesis kit (RPN 1256 Amersham, Amersham England) according to the manufacturer's instructions. This cDNA strand and the two synthesized degenerated "sense" and "antisense" oligonucleotides were used in a polymerase chain reaction

(PCR, Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA, according to manufacturer's instruction) to synthesize the base sequence encoded for the amino acid residues 8-16 (formula IA) as a cDNA fragment. The base sequence of this cDNA fragment is as follows: 5'-AGGGAGAAGAGAGATAGTGTGTGTCCC-3'. This cDNA fragment was used as probe to identify a cDNA clone encoded for the 55 kDa TNF-BP in a λ gt 11-cDNA-gene bank of human placenta (42,43) through known procedures. This clone was then cut from the λ -vector with the usual methods and cloned into the M13mp18/M13mp19 bacteriophages (Pharmacia, Uppsala, Sweden) (42,43). The nucleotide sequence of this cDNA clone was determined by means of a sequenase kit (U.S. Biochemical, Cleveland, Ohio, USA) according to information from the manufacturer. The nucleotide sequence and derived from it the amino acid sequence for the 55 kDa TNF-BP and its signal peptide -- (amino acid "-28" to amino acid "0") is illustrated in Fig.1 with abbreviations for bases and amino acids customary at the present state of technology. From sequence comparisons with other already known receptor protein sequences about 180 N-terminals containing amino acids as well as 220 C-terminal domains containing amino acid may be identified, which are separated by a transmembrane region of 19 amino acids (underlined in Fig.1) typical according to sequence comparisons. Hypothetical glycosylation locations are marked with stars above the corresponding amino acid in Fig.1 .

Analog technologies were employed basically for identification of partial cDNA sequences encoded for 75/65 kDa TNF-BP with, in this case, genomic human DNA and from peptide IIA derived completely degenerated 14-mer (polymer ..Transl.) and 15-mer "sense and "antisense" nucleotides being used, to produce a primary, 26 bp cDNA probe in a polymerase chain reaction. This cDNA probe was then used for identification of cDNA clones of various lengths in a HL-60 cDNA library. This cDNA library was produced by means of isolated HL60 RNA and a cDNA cloning kit (Amersham) per instructions of the manufacturer. The sequence of such a cDNA clone is illustrated in Fig.4, with repeated sequencing leading to the

following correction . In place of the serine in position 3 a threonine must be put which is encoded by "ACC" and not by "TCC".

Example 9

Expression in COS 1-Cells

For the expression in COS cells vectors were constructed which originated from plasmid "pN11". The plasmid "pN11" contains the efficient promoter and enhancer of the "major immediate-early" gene of the human cytomegalovirus ("HCMV"; Boshart et al., Cell 41 , 521-530, 1985). Behind the promoter there is a short DNA sequence, containing several restriction interfaces that occur only once in the plasmid ("polylinker"), among them the interfaces for HindIII, BglI, BamHI and PvuII (see sequence).

PvuII

5'- AAGCTTGGCCAGGATCCAGCTGACTGACTGATCGCGAGATC-3'

3'- TTCGAACCGGTCCTAGGTCGACTGACTGACTAGCGCTCTAG-5'

Behind these interfaces there are three translation stop codons in all three reading rasters . Behind the polylinker sequence is the second intron and the polyadenylation signal for the preproinsulin gene of the rat (Lomedico et al. Cell 18, 545-558, 1979). The plasmid contains furthermore the replication origin of the SV40 virus as well as a fragment from pBR322, which confers ampicillin resistance on E. coli bacteria and makes possible the replication of the plasmid in E. coli .

For construction of the expression vector "pN123" this plasmid "pN11" was cut with the restriction endonuclease PvuII and subsequently treated with alkaline phosphatase. The dephosphorylated vector was then isolated from an agarose gel (V1). The 5' overhanging nucleotides of the EcoRI cut 1.3 kb fragments of the 55 kDa TNF-BP-cDNA (see Example 8) were filled with the help of Klenow enzyme. Subsequently this fragment was isolated from an agarose gel (F1).

Afterwards V1 and F1 were united by means of T4 ligase. *E. coli* HB 101 cells were then transformed with this ligation batch according to familiar methods [42]. With the aid of restriction analyses and DNS sequencing according to familiar methods [42] transformants were identified, which had been transformed with a plasmid that contained the 1.3kb EcoRI fragment of the 55 kDa TNF-BP-cDNA in correct orientation for the expression via the HCMV promoter. This vector received the designation "pN123".

The following procedure was used for construction of the vector "pK19". A DNA fragment, which contains only the cDNA coded for the extracellular part of the 55 kDa TNF-BP (amino acids -28 to 182 according to Fig.1) was obtained by means of PCR technology (Saiki et al., Science 230, 1350-1354, 1985, see also Example 8). The following oligonucleotides were used for amplification of the cDNA encoded for the extracellular part of 55 kDa TNF-BP from "pN123".

BAMHI

5'-CACAGGGATCCATAGCTGTCTGGCATGGCCTCTCCAC-3'

ASP718

3'-CGTGACTCCTGAGTCCGTGGTGTATTATCTCTAGACCATGGCCC-5'

By means of these nucleotides two stop codons of the translation were also introduced behind amino acid 182. The thus amplified fragment was cut with BamHI and Asp718 and the resulting projecting ends were filled with the aid of the Klenow enzyme; this fragment was subsequently isolated from an agarose gel (F2). F2 was then ligated with V1 and the whole batch used for transformation of *E. coli* HB101, as already described. Transformants which were transformed with a plasmid that contained the DNA fragment in correct orientation for expression via the HCMV-promoter, were identified by means of DNA sequencing (see above). The plasmid isolated from it received the designation "pK19".

Transfection of the COS cells with plasmids "pN123 or "pK19" was carried out according to the lipofection method published by Felgner et al. (Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 84 , 7413-7417, 1987). 72 hours after the completed transfection the cells transfected with "pN123" were analyzed according to known methods with ^{125}I -TNF α for binding. The result of the Scatchard analysis [Scatchard, G., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660, 1949] of binding data obtained in that way (Fig.2A) is illustrated in Fig. 2B. The culture supernatants of the cells transfected with "pK19" were investigated in a "sandwich" test. For that purpose PVC microtitre plates (Dynatech, Arlington, VA, USA) with 100 μ /hole of a rabbit-anti-mouse immunoglobulin (10 μ g/ml PBS) were sensitized. The plate was subsequently washed and incubated (3 hours, 20°C) with an anti-55 kDa TNF-BP antibody, which was detected according to Example 3 through its antigen binding and isolated, but does not inhibit TNF binding to cells. The plate was then washed again and incubated overnight at 4°C with 100 μ l/hole of the culture supernatants (diluted 1:4 with buffer A containing 1% defatted milk powder: 50 mM Tris/HCl pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.02% Na-azide). The plate was emptied and incubated with buffer A (10⁶ cpm/ml, 100 μ l/hole) containing ^{125}I -TNF α with or without addition of 2 μ g/ml unmarked TNF for two hours at 4°C . Afterwards the plate was washed four times with PBS, the individual holes were cut out and measured in a γ -counter. The results of five parallel transfections (columns # 2,3,4,6 and 7), of two control transfections with the pN11 vector (columns #1,5) and of a control with HL60-cell lysate (column #8) are illustrated in Fig. 3.

Example 10

Expression in Insect Cells

For expression in a baculovirus expression system a start was made with the plasmid "pVL941" (Luckow and Sommers, 1989, "High Level Expression of Nonfused Foreign Genes with Autographa California Nuclear Polyhedrosis virus Expression Vectors", Virology 170, 31-39), which was modified as follows. The sole EcoRI-interface in "pVL941" was removed by cutting the plasmid with EcoRI and filling

the protruding 5' ends with Klenow enzyme. The thus obtained plasmid pVL941/E- was digested with BamHI and Asp718 and the vector rump subsequently isolated from an agarose gel. This fragment was ligated with a synthetic oligonucleotide of the following sequence:

	BamHI	EcoRI	Asp718	
5'	-	GATCCAGAATTCATAATAG	-	3'
3'	-	GTCTTAAGTATTATCCATG	-	5'

E. coli HB101 was transformed with the ligation batch and transformants, which contained a plasmid in which the oligonucleotide was correctly inserted, were identified through restriction analysis and DNA sequencing according to known methods (see above); this plasmid was called "PNR704". For construction of the transfer vector "pN113" this plasmid "PNR704" was cut with EcoRI, treated with alkaline phosphatase and the thus generated vector rump (V2) was subsequently isolated from an agarose gel. The 1.3 kb fragment of 55 kDa TNF-BP-cDNA, cut with EcoRI like above, was ligated with fragment V2. Transformants obtained with this ligation batch, which contained a plasmid that contained the cDNA insert in the correct orientation for expression via the polyhedrin promoter, were identified (see above). The vector isolated from it received the designation "PN113".

The following steps were taken for construction of the transfer vector "pN119". The 1.3 kb EcoRI/EcoRI-fragment of the 55 kDa TNF-BP cDNA in the "pUC19" plasmid (see Example 8) was digested with BstI and ligated with the following synthetic oligonucleotide :

	BstI	Asp718	
5'	-	GCACCACATAATAGAGATCTGGTACCGGGAA	- 3'
3'	-	GTGTATTATCTCTCTAGACCATGGCCC	- 5'

By means of the above adapter two stop codons of the translation behind amino acid 182 and an interface for the restrictions endonuclease Asp718 are

inserted. After completed ligation the batch was digested with EcoRI and Asp718 and the partial 55 kDa TNF-BP fragment (F3) was isolated. Furthermore plasmid "pNR704", which was also cut with Asp718 and EcoRI, was ligated with F3 and the ligation batch transformed in *E. coli* HB101. Identification of the transformants, which contained a plasmid in which the partial 55 kDa TNF-BP cDNA was integrated correctly for the expression, was carried out as already described. The plasmid isolated from these transformants received the name "pN119".

The following procedure was followed in construction of the transfer vector "pN124". The cDNA fragment described in Example 9, which encodes for the extra-cellular part of 55 kDa TNF-BP, was amplified with the oligonucleotides mentioned by means of PCR technology, as described in Example 9. This fragment was cut with BamHI and Asp718 and isolated from an agarose gel (F4). The plasmid "pNR704" was also cut with BamHI and Asp718 and the vector rump (V4) was isolated (see above). The fragments V4 and F4 were ligated, used to transform *E. coli* HB101 and the recombinant transfer vector "pN124" was identified and isolated, as described.

The following procedure was used for transfection of insect cells. 3 μ g of the transfer vector "pN113" were transfected with 1 μ g DNA of Autographa californica-nuclear-polyhedrosis virus (AcMNPV) (EP 127839) in Sf9 cells (ATCC CRL 1711). Polyhedrin negative viruses were identified and purified from "Plaques" [52]. With these recombinant viruses Sf9 cells were again infected as described in [52]. After 3 days in the culture the infected cells were examined for binding of TNF with 125 I-TNF α . For that purpose the transfected cells were washed with a Pasteur pipette from the cell culture dish and, with a cell density of 5×10^6 cells/ml culture medium [52] containing 10 ng/ml 125 I-TNF α , as well as in the presence and absence of 5 μ g/ml unmarked TNF α , they were resuspended and incubated on ice for two hours. Afterwards the cells were washed with a clean culture medium and the cellbound radioactivity was counted with a γ -counter (see Table 2).

Table 2

Cells	Cellbound radioactivity/ 10^6 cells
Non-infected cells (control)	60 cpm
Infected cells	1600 ± 330 cpm ¹⁾

¹⁾ Average value and std. deviation from 4 experiments

Example 11

Analogous to the method described in Example 9 the cDNA fragment encoded for the extracellular range of the 55 kDa TNF-BP was now amplified in a polymerase chain reaction with the following oligonucleotides as primers :

Oligonucleotide 1 : - - - - -

Sst I

5' - TAC GAG CTC GGC CAT AGC TGT CTG GCA TG - 3'

Oligonucleotide 2 :

Sst I

5' - ATA GAG CTC TGT GGT GCC TGA GTC CTC AG -3'

This cDNA fragment was ligated into the pCD4-Hy 3-vector [DSM 5523; European Patent Application Nr. 90107393.2; Japanese Patent Application Nr. 108967/90; US Patent Application Ser. No. 510773/90], from which the CF4-cDNA had been removed via the Sst I-restriction interfaces. Sst interfaces are present in vector pCD4-H 3 before, inside and behind the CD4 partial sequence section. The construct was transfected by means of protoplast fusion according to Oi et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80 , 825-829, 1983) in J558-myeloma cells (ATCC Nr. TIB6). Transfectants were

selected into the basic medium (Dulbecco's modified Eagle's medium, 10% fetal calves' serum, 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol) by addition of 5 µg/ml myphenolic acid and 250 µg/ml xanthine (Traunecker et al., Eur. J. Immunol. 16, 851-854 [1986]). The expression product secreted by the transfected cells could be purified through the usual methods of protein chemistry, for instance TNF-BP antibody affinitychromatography. Where not already specifically mentioned, standard methods like for example that of Freshney, R.I. in "Culture of Animal Cells", Alan R. Liss, Inc. New York (1983) were used for growing the cell lines used, for cloning, selecting, resp. for expansion of the cloned cells.

Bibliography

1. G.E. Nedwin, S.L. Naylor, A.Y. Sakaguchi, D. Smith, J. Jarrett-Nedwin, D. Pennica, D.V. Goeddel and P.W. Gray: Nucl. Acids Res. 13, 6361, 1985
2. B. Beutler and A. Cerami: New England J. Med. 316, 379, 1987
3. L.J. Old: Science 230, 630, 1985
4. G. Trinchieri, M. Kobayashi, M. Rosen, R. Loudon, M. Murphy and B. Perussia: J. exp. Med. 164, 1206, 1986
5. J. Vilcek, V.J. Palombella, D. Henriksen-de Stefano, C. Swenson, R. Feinman, M. Hirai and M. Tsujimoto: J. exp. Med. 163, 632, 1986
6. B.J. Sugarman, B.B. Aggarwal, P.E. Hass, I.S. Figari, M.A. Palladino and H.M. Shepard: Science 230, 943, 1985
7. J.R. Gamble, J.M. Harlan, S.J. Klebanoff and M.A. Vadas: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 8667, 1985
8. N. Sato, T. Goto, K. Haranaka, N. Satomi, H. Nariuchi, Y. Mano and Y. Sawasaki: J. Natl. Cancer Inst. 76, 1113, 1986
9. A.H. Stolpen, E.C. Guinan, W. Fiers and J.S. Pober: Am. J. Pathol. 123, 16, 1986
10. J.S. Pober, L.A. Lapierre, A.H. Stolpen, T.A. Brock, T.A. Springer, W. Fiers, M.P. Bevilacqua, D.L. Mendrick and M.A. Gimbrone: J. Immunol. 138, 3319, 1987
11. M. Kawakami, P. Pekala, M. Lane and A. Cerami: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 912, 1982
12. T. Collins, L.A. Lapierre, W. Fiers, J.L. Strominger and J.S. Pober: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 446, 1986
13. G.H.W. Wong and D.V. Goeddel: Nature 323, 819, 1986
14. J.W. Lowenthal, D.W. Ballard, E. Böhlein and W.C. Greene: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 2331, 1989
15. M.J. Lenardo, C.M. Fan, T. Maniatis and D. Baltimore: Cell 57, 287, 1989
16. A.E. Goldfeld and T. Maniatis: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1490, 1989
17. A. Waage, A. Halstensen and T. Espevik: Lancet, Febr. 14, 1987, 355.
18. C.O. Jacob and H.O. McDavitt: Nature 331, 356, 1988
19. G.E. Grau, L.F. Fajardo, P. Piguot, B. Allot, P. Lambert and P. Vassalli: Science 237, 1210, 1987
20. B. Beutler, I.W. Milsark and A.C. Cerami: Science 229 869, 1985
21. B.B. Aggarwal, T.E. Eessalu and P.E. Hass: Nature 318, 665, 1985
22. M. Tsujimoto, Y.K. YiP and J. Vilcek: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7626, 1985
23. C. Baglioni, S. McCandless, J. Tavernier and W. Fiers: J. Biol. Chem. 260, 13395, 1985
24. P. Hohmann, R. Remy, M. Brockhaus and A.P.G.M. van Loon: J. Biol. Chem., im Druck
25. F.C. Kull, S. Jacobs and P. Cuatrecasas: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5756, 1985
26. A.A. Creasy, R. Yamamoto and Ch.R. Vitt: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3293, 1987
27. G.B. Stauber, R.A. Aiyer and B.B. Aggarwal: J. Biol. Chem. 263, 19098, 1988
28. K. Hirano, K. Yamamoto, Y. Kobayashi and T. Osawa: J. Biochem. 105, 120, 1989

29. Y. Niitsu, N. Watanabe, H. Sone, H. Neda, N. Yamauchi, M. Maeda and I. Urushizaki: *J. Biol. Resp. Modifiers* **7**, 276, 1988
30. I. Olsson, A. Grubb, U. Gullberg, M. Lantz, E. Nilsson, C. Peetre and H. Thysell: Abstract. 2nd Intern. Conference on Tumor Necrosis Factor and Related Cytokines, Napa, California, 15.-20. Januar 1989
31. H.R. Lötscher and M. Brockhaus: Abstract. 2nd Intern. Conference on Tumor Necrosis Factor and Related Cytokines, Napa, California, 15.-20. Januar 1989
32. M. Brockhaus, H. Lötscher, H.-P. Hohmann und W. Hunziker: Abstract. 2nd Intern. Conference on Tumor Necrosis Factor and Related Cytokines, Napa, California, 15.-20. Januar 1989
33. C.R. Cantor and P.R. Schimmel, in *Biophysical Chemistry*, W.H. Freeman, ed., San Francisco, 1980, p. 850
34. M.W. Hunkapiller, E. Lujan, F. Ostrander, L.E. Hood: *Methods Enzymol.* **91**, 227, 1983
35. U.K. Lamli: *Nature* **227**, 680, 1970
36. T.St. John, W.M. Gallatin, M. Siegelman, H.T. Smith, V.A. Fried and I.L. Weissman: *Science* **231**, 845, 1986
37. M. Siegelman, M.W. Bond, W.M. Gallatin, T.St. John, H.T. Smith, V.A. Fried and I.L. Weissman: *Science* **231**, 823, 1986
38. H. Towbin, T. Staehelin and J. Gordon: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350, 1979
39. Dinarello, Ch.A., in *Lymphokines*, Vol. 14, E. Pick, ed., p. 1, Academic Press, London, 1987
40. D.J. Merchant, R.H. Kahn and W.H. Murphy: *Handbook of Cell and Organ Culture*, Burgess Publ. Co., Minneapolis, 1969
41. G.E. Grau, T.E. Taylor, M.E. Molyneux, J.J. Wirima, P. Vassalli, M. Hommel and P. Lambert: *New Engl. J. Med.* **320**, 1586, 1989
42. J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
43. F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.A. Smith, J.G. Seidman and K. Struhl: *Current Protocols in Molecular Biology 1987-1988*, S. Wiley and Sons, New York, 1987
44. E. Harlow and D. Lane: *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Publications, New York, 1988
45. S.Fazekas de St. Groth and D. Scheidegger: *J. Immunol. Methods* **35**, 1, 1980
46. D. Pennica and D.V. Goeddel, in *Lymphokines*, Vol. 13, D.R. Webb and D.V. Goeddel, eds. p. 163, Academic Press, London, 1987
47. J. Tavernier, L. Franzen, A. Marmenout, J. van der Heyden, R. Muller, M. Ruysschaert, A. van Vliet, R. Banden and W. Fiers, in *Lymphokines*, Vol. 13, D.R. Webb and D.V. Goeddel, eds., p. 181, Academic Press, London
48. P.J. Fraker and J.C. Speck: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **80**, 849, 1987
49. D.H. Erlich, D.H. Gelfand, R.K. Saiki: *Nature* **331**, 61, 1988
50. Bosserhoff, J. Wallach and R.W. Frank: *J. Chromatogr.* **473**, 71, 1989
51. R. Lathe: *J. Mol. Biol.* **183**, 1, 1985
52. Luckow and Summers, "A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures", Texas Agricultural Experimental Station, Texas A & M University, Bulletin Nr. 1555, 2nd edition, 1988

Claims

1. Non-soluble proteins and soluble or non-soluble fragments thereof, which bind TNF in homogeneous form, as well as their physiologically compatible salts.
2. Compounds according to Claim 1, which are characterized by molecular masses according to SDS-PAGE under nonreducing conditions of about 55 kDa and 75 kDa.
3. Compounds according to one of the Claims 1 and 2, which contain at least one

Leu-Val-Pro-His-Leu-Gly-Asp-Arg-Glu-Lys-Arg-Asp-Ser-Val-Cys-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-X-Asn-Ser-Ile;
 Ser-Thr-Pro-Glu-Lys-Glu-GlyGlu-Leu-Glu-Gly-Thr-Thr-Thr-Lys;
 Leu-Pro-Ala-Gln-Val-Ala-Phe-X-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr-Cys;
 Ile-X-Pro-Gly-Phe-Gly-Val-Ala-Tyr-Pro-Ala-Glu-Pro-Leu-Glu;
 Ser-Gln-Leu-Glu-Thr-Pro-Glu-Thr-Leu-Leu-Gly-Ser-Thr-Glu-Glu-Lys-Pro-Leu;
 Val-Phe-Cys-Thr;
 Asn-Gln-Pro-Gln-Ala-Pro-Gly-Val-Glu-Ala-Ser-Gly-Ala-Gly-Glu-Ala;
 Leu-Cys-Ala-Pro;
 Val-Pro-His-Leu-Pro-Ala-Asp;
 Gly-Ser-Gln-Gly-Pro-Glu-Gln-Gln-Gln-X-X-Leu-Ile-X-Ala-Pro

where X stands for an unidentified acid residue.

4. TNF sequences which are encoded for non-soluble proteins or soluble as well as non-soluble fragments thereof, that bind TNF, with such DNS sequences to be selected from the following:
 - (a) DNA sequences, as shown in Fig.1 or Fig.4 as well as their complementary strands, or those that these sequences include;
 - (b) DNA sequences, which hybridize with sequences as defined under (a) or with their fragments.
 - (c) DNA sequences, which do not hybridize with sequences as defined under (a) and (b), because of degeneracy of the genetic code, but which are encoded for polypeptides with exactly the same amino acid sequence.
5. DNA sequences according to Claim 4, which include a combination of two partial DNA sequences, with one partial sequence encoded for soluble fragments of non-soluble proteins that bind TNF, and the other partial sequence encoded for all domains save the first of the constant region of the heavy chain of human immunoglobulins, like IgG, IgA, IgM resp. IgE.
6. DNA sequences according to Claim 5, with said human immunoglobulins being of

the IgM type resp. those of class IgG.

7. DNA sequences according to Claim 6, where said human immunoglobulins are those of type Ig1 resp. Ig3.

8. Recombinant proteins from DNA sequences encoded according to one of the Claims 4-7, such as allelic variants, or deletion analogs, substitution analogs or addition analogs thereof.

9. Vectors, which contain DNA sequences according to one of the Claims 4-7 and are suitable for expression of proteins encoded by these DNA sequences in prokaryotic as well as eukaryotic host systems.

10. Prokaryotic as well as eukaryotic host systems which have been transformed with a vector according to Claim 9.

11. Host systems according to Claim 10, which are mammalian or insect cells.

12. Antibodies directed against a compound according to one of the Claims 1-3 or 8.

13. A method for isolation of a compound according to one of the Claims 1-3, characterized in that the following purification steps are carried out sequentially: production of a cell extract, immunoaffinity chromatography and/or simple or multiple ligandaffinity chromatography, HPLC and preparative SDS-PAGE and if so desired cleavage of the compounds thus isolated and/or transference into suitable salts.

14. A method for production of a compound per Claim 8, which is characterized in that a transformed host system according to Claim 10 or 11 is cultivated in a suitable medium and in that such compounds are isolated from the host system proper or from the medium.

15. Pharmaceutical preparations, characterized in that they contain one or more compounds according to one of the Claims 1-3 or 8, if so desired in combination with additional pharmaceutically effective substances and/or non-toxic, inert, therapeutically compatible carrier materials.

16. Pharmaceutical preparations for treatment of diseases, in which TNF is involved, where such preparations are characterized in that they contain one or more compounds

according to one of the Claims 1-3 or 8, if so desired in combination with additional pharmaceutically effective substances and/or non-toxic, inert, therapeutically compatible carrier materials.

17. Use of a compound according to one of the Claims 1-3 or 8 for treatment of diseases.

18. Use of a compound according to one of the Claims 1-3 or 8 for treatment of diseases, in which TNF is involved.

19. A compound as claimed in one of the Claims 1-3 or 8 whenever it has been produced by a method as claimed in Claims 13 or 14.

Figur 1 (Forts.) Fig.1 (cont.)

310 GlnLysTrpGluAspSerAlaHisLysProGlnSerLeuAspThrAspAspProAlaThr
 1015 CAGAAGTGGGAGGACAGCGCCCAAGCCACAGAGCCTAGACACTGATGACCCCGCGACG

 330 LeuTyrAlaValValGluAsnValProProLeuArgTrpLysGluPheValArgArgLeu
 1075 CTGTACGCCCGTGGTGGAGAACGTGCCCCCGTTGCGCTGGAAGGAATTCGTGCGGCGCCTA

 350 GlyLeuSerAspHisGluIleAspArgLeuGluLeuGlnAsnGlyArgCysLeuArgGlu
 1135 GGGCTGAGCGACCACGAGATCGATCGGCTGGAGCTGCAGAACGGGCGCTGCCTGCGCGAG

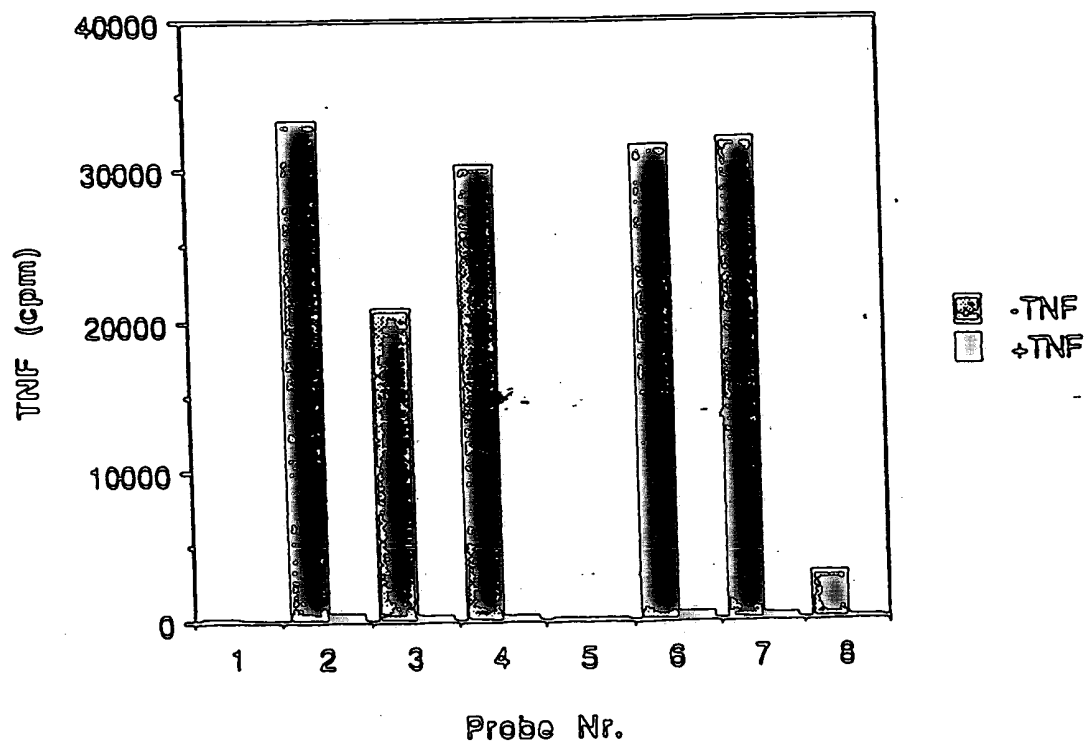
 370 AlaGlnTyrSerMetLeuAlaThrTrpArgArgArgThrProArgArgGluAlaThrLeu
 1195 GCGCAATACAGCATGCTGGCGACCTGGAGGCGGCGCACGCCGCGGCGCGAGGCCACGCTG

 390 GluLeuLeuGlyArgValLeuArgAspMetAspLeuLeuGlyCysLeuGluAspIleGlu
 1255 GAGCTGCTGGGACGCGTGCTCCGCGACATGGACCTGCTGGGCTGCCTGGAGGACATCGAG

 410 GluAlaLeuCysGlyProAlaAlaLeuProProAlaProSerLeuLeuArg
 1315 GAGGCGCTTTGCGGCCCCGCGCCCTCCCGCCCGCGCCAGTCTTCTCAGATGAGGCTGC
 1375 GCCCCTGCGGGCAGCTCTAAGGACCGTCTGCGAGATCGCCTTCCAACCCCACTTTTTTC
 1435 TGGAAAGGAGGGGTCTGCGAGGGCAAGCAGGAGCTAGCAGCGCGCTACTTGGTGCTAAC
 1495 CCCTCGATGTACATAGCTTTTCTCAGCTGCCTGCGCGCCGCGCGACAGTCAGCGCTGTGCG
 1555 CGCGGAGAGAGGTGCGCCGTGGGCTCAAGAGCCTGAGTGGGTGGTTTGGGAGGATGAGGG
 1615 ACGCTATGCCTCATGCCCGTTTTGGGTGTCTCACCAGCAAGGCTGCTCGGGGGCCCCCTG
 1675 GTTCGTCCCTGAGCCTTTTTCACAGTGCATAAGCAGTTTTTTTTGTTTTGTTTTGTTTT
 1735 GTTTTTGTTTTTAAATCAATCATGTTACACTAATAGAACTTGGCACTCCTGTGCCCTCTG
 1795 CCTGGACAAGCATAGCAAGCTGAAGTGTCTAAGGCAGGGCGGAGCACGGAACAATGG
 1855 GGCCTTCAGCTGGAGCTGTGGACTTTTGTACATACACTAAAATTCTGAAGTAAAAAAA
 1915 AACCCGAATTC

Figure 3 Fig.3

Sandwich-Test



25

Figur 4 (Fortsetzung) Fig.4 (continuation)

281 ProGlyValGluAlaSerGlyAlaGlyGluAlaArgAlaSerThrGlySerSerAlaAsp
 841 CCAGGCGTGGAGGCCAGTGGGGCCGGGGAGGCCCGGGCCAGCACCGGGAGCTCAGCAGAT
 301 SerSerProGlyGlyHisGlyThrGlnValAsnValThrCysIleValAsnValCysSer
 901 TCTTCCCCTGGTGGCCATGGGACCCAGGTCAATGTCACCTGCATCGTGAACGTCTGTAGC
 321 SerSerAspHisSerSerGlnCysSerSerGlnAlaSerSerThrMetGlyAspThrAsp
 961 AGCTCTGACCACAGCTCACAGTGCTCCTCCCAAGCCAGCTCCACATGGGAGACACAGAT
 341 SerSerProSerGluSerProLysAspGluGlnValProPheSerLysGluGluCysAla
 1021 TCCAGCCCCCTCGGAGTCCCCGAGGACGAGCAGGTCCCCTTCTCCAGGAGGAATGTGCC
 361 PheArgSerGlnLeuGluThrProGluThrLeuLeuGlySerThrGluGluLysProLeu
 1081 TTTCGGTCACAGCTGGAGACGCCAGAGACCCTGCTGGGGAGCACCGAGAGAGCCCCCTG
 381 ProLeuGlyValProAspAlaGlyMetLysProSer
 1141 CCCCTTGGAGTGCCTGATGCTGGGATGAAGCCCAGTTAACCAGGCCGGTGTGGGCTGTGT
 1201 CGTAGCCACAGGTGGCTGAGCCCTGGCAGGATGACCCTGCGAAGGGGGCCCTGGTCCCTCCA
 1261 GGCCCCCACCCTAGGACTCTGAGGCTCTTTCTGGGCCAAGTTCTCTAGTGGCCCTCCAC
 1321 AGCCGCAGCCTCCCTCTGACCTGCAGGCCAAGAGCAGAGGCAGCGAGTTGTGGAAAGCCT
 1381 CTGCTGCCATGGCGTGTCCCTCTCGGAAGGCTGGCTGGGCATGGACGTTCCGGGGCATGCT
 1441 GGGGCAGTCCCTGAGTCTCTGTGACCTGCCCCGCCAGCTGCACCTGCCAGCCTGGCTT
 1501 CTGGAGCCCTTGGGTTTTTTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTCTCCCCCTGGGC
 1561 TCTGCCCAGCTCTGGCTTCCAGAAACCCAGCATCCTTTTCTGCAGAGGGGCTTTCTGG
 1621 AGAGGAGGGATGCTGCCCTGAGTCACCCATGAAGACAGGACAGTGCTTCAGCCTGAGGCTG
 1681 AGACTGCGGGATGGTCCCTGGGGCTCTGTGCAGGGAGGAGGTGGCAGCCCTGTAGGGACG
 1741 GGGTCCTTCAAGTTAGCTCAGGAGGCTTGGAAAGCATCACCTCAGGCCAGGTGCAGTGGC
 1801 TCACGCCTATGATCCAGCACTTTGGGAGGCTGAGGCGGGTGGATCACCTGAGGTTAGGA
 1861 GTTCGAGACCAGCCTGGCCACATGGTAAACCCCATCTCTACTAAATACAGAAATTA
 1921 GCCGGGCGTGGTGGCGGGCACCTATAGTCCAGCTACTCAGAGCCTGAGGCTGGGAAT
 1981 CGTTTGAACCCGGGAAGCGGAGGTTGCAGGGAGCCGAGATCAGCCACTGCACTCCAGCC
 2041 TGGGCGACAGAGCGAGAGTCTGTCTCAAAAGAAAAAAGACACCGCCTCCAAATGCT
 2101 AACTTGCTCTTTGTACCATGGTGTGAAGTCAGATGCCAGAGGGGCCAGGCAGGCCAC
 2161 CATATTCAAGTGCTGTGGCCTGGGCAAGATAACGCACTTCTAAGTAATCTGCCAATTT
 2221 TTTAAAAAGTAAGTACCACTCAGGCCAACAAGCCACGACAAAGCCAACTCTGCCAGC
 2281 CACATCCAAACCCCCACCTGCCATTTGCACCTCCGCCTTCACTCCGGTGTGCCTGCAG

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.